

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Enriquecimiento ambiental, corteza prefrontal y
envejecimiento cerebral : efectos neuroquímicos y
conductuales del estrés**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Pedro Garrido Vega

DIRECTOR:

Francisco (Mora Teruel) dir Mora

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5327640966

T577.175.82

GAR
enr

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL, CORTEZA
PREFRONTAL Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL: EFECTOS
NEUROQUÍMICOS Y CONDUCTUALES DEL ESTRÉS.

Pedro Garrido Vega



Tesis Doctoral

Madrid 2010

R139541587

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

Ciudad Universitaria, s/n
28040 Madrid

D. FRANCISCO MORA TERUEL, Catedrático de Fisiología Humana de la
Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada “Enriquecimiento ambiental, corteza prefrontal y envejecimiento cerebral: efectos neuroquímicos y conductuales del estrés” que presenta D. PEDRO GARRIDO VEGA para optar al Grado de Doctor ha sido realizada bajo su dirección.

Madrid a 28 de abril de 2010



Dr. Francisco Mora

AGRADECIMIENTOS.

Pedro nace en Madrid. Sólo por ese hecho ya debería estar agradecido a muchas personas o al Universo entero, pero entre ellas escogerá, en primer lugar, y por razones obvias, a sus progenitores, Juan y Nazaret, por ser los más cercanos, tanto emocional como genéticamente. Y no sólo les debe su alumbramiento, sino muchas otras cosas que no tiene tiempo para enumerar en tan poco y tan blanco espacio, pero ellos ya saben que yo. Y tan cercana como ellos, o incluso más, está su hermana, a la que agradece, simplemente, ser su hermano, y a la que ayudará en todo lo que necesite siempre, pero ella ya sabe eso y muchas más cosas que yo.

Pasan los años y Pedro toma conciencia de su primera amistad. Es Guillermo, a quien mucho debe. La amistad se diluye, pero no el agradecimiento. Llegan después Cayetano y Eloy. Alguna intermitencia en su relación, pero no en la amistad que les une y que se perpetúa, una especie de atavismo que no es posible ya eliminar. También por entonces encuentra a Agustín, un oasis, del que pierde noticias durante varios años y al que recupera como si nada ocurriese, como si siempre hubiese permanecido ahí, impasible, como oasis que es. Con los años pasan también Ana, Linda o Rosa, pues si los amigos conforman al hombre, no menos lo hacen los amores, aunque sean éstos cortos o desgraciados. Después, Josué, Quique y Ricardo. Tener estos amigos es disponer de tres virtudes. Le han dado más de lo que pueden imaginar y su agradecimiento hacia ellos nunca será suficiente. Y llega también Tamara. Si los amores y los amigos conforman al hombre, Tamara es entonces un privilegio y un don. Y nada más que añadir a esto. Por último llegan otras sorpresas inesperadas (Ana, David, Nacho, Mourat) a las que también debe agradecer muy buenos ratos y que, sin saberlo, le ayudaron en momentos difíciles.

Siguen pasando los años y el Dr. Mora le acepta en su laboratorio, gesto que asume como un privilegio, y fruto de lo cual es este modesto trabajo del que espera, él se sienta parte importante. Está en el laboratorio Alberto, con el que es un placer discutir y hablar en general, y un excelente maestro, aunque no sea consciente de ello, o no quiera reconocerlo. También está Gregorio, del que siempre aprende cómo pensar de forma crítica (para lo bueno y para lo malo) y del que admira su capacidad para arrastrarse por cuevas inmundas de las que extrae, impoluto, ese ignoto artículo que nadie antes había osado buscar. No debe olvidar a Ángela, de la que es imposible no destacar su sonrisa y disposición permanentes, y la sensación de haber conocido a una muy buena persona. Un poco más allá, esta vez no en el tiempo, sino en el espacio, se encuentran Juanjo y Concha, que le han ayudado siempre en todo aquello que ha necesitado.

No puede olvidarse de su marcha durante unos pocos meses a la pérfida Albión, y de ello tiene que agradecer mucho al Dr. Robbins y al Dr. Dalley, y a algunos de los que allí le ayudaron a tener una experiencia que hoy ve como un sueño o, como una utopía, que acaso sean lo mismo: Anna, Gonzalo, Dawn, Melissa, Morganne. Ruth. Guarda un recuerdo excelente de todos ellos. Y llega casi al final del recuerdo de las personas importantes que han pasado por su vida. Están también, María y Giacomo, los nuevos, aunque ya no tan nuevos, que le han tenido que soportar durante estos últimos meses, como Isa, que ya no está pero también tuvo que hacerlo. A Marta le debe mucho más que el ser compañera de trabajo. También amiga y confidente y muchas otras cosas que se calla porque la página se tornaría carmín y desentonaría en tan blanco espacio.

Por el camino ha perdido a Ricardo, su abuelo, del que conserva el maravilloso recuerdo de aquellas mañanas que le llevaba a ver los trenes de mercancías larguísimos que se arrastraban pesadamente por la estación cercana a su casa. No ha perdido, y espera que se conserven por muchos años, a sus abuelos Pedro y Catalina, que le han querido siempre como sólo unos abuelos pueden hacerlo. Les debe tanto que con este agradecimiento no es suficiente. Por eso les dedica esta tesis, que es el trabajo de casi seis años de su vida. Este gesto no compensa, sin embargo, la pantagruélica deuda que Pedro tiene con ellos.

Pedro no sería quien es si no leyese hasta caerse de sueño. Por eso en sus agradecimientos debe incorporar a Borges, Cervantes, Cortázar, Perec, Maganelli, Bolaño, Dostoievski y muchos otros (la lista podría tener la longitud de esta tesis, tómese pues este agradecimiento como un intento sintético), que le han permitido ser quien es y saber muchas de las pocas cosas que sabe (o cree saber). No debe tampoco olvidar a Darwin y a Cajal (sin los cuales sus estudios e intereses no serían los que son).

Y arribo a María, que es un puerto, pero también una inmensa isla y unos ojos que me miran y una vida por completar. Eras también, ¿te acuerdas?, una posibilidad que no contemplaba. Ahora sólo te contemplo. Nos queda tanto...

Etc.

A mis abuelos, Pedro y Catalina.

ÍNDICE:

ABREVIATURAS.	v
INTRODUCCIÓN.	
1.Enriquecimiento ambiental.	1
1.1. Efectos neuroanatómicos del enriquecimiento ambiental.	2
1.2. Efectos neuroquímicos del enriquecimiento ambiental.	2
1.3. Efectos conductuales del enriquecimiento ambiental.	4
1.4. Efectos protectores y reparadores del enriquecimiento ambiental.	5
2.Envejecimiento.	8
2.1. Efectos neuroanatómicos del envejecimiento.	9
2.2. Efectos neuroquímicos del envejecimiento.	
2.2.1.Efectos del envejecimiento sobre el sistema dopaminérgico.	10
2.2.2.Efectos del envejecimiento sobre el sistema colinérgico.	12
2.2.3.Efectos del envejecimiento sobre el sistema glutamatérgico.	13
2.3.Efectos del envejecimiento sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.	16
2.4.Efectos conductuales del envejecimiento.	18
3.La corteza prefrontal.	
3.1.Estructura neuroanatómica de la corteza prefrontal	20
3.2.Estructura neuroquímica de la corteza prefrontal.	
3.2.1. Dopamina.	23
3.2.2.Acetilcolina.	27
3.2.3.Glutamato.	30
3.3.Funciones de la corteza prefrontal.	
3.3.1.Actividad motora.	34
3.3.2.Memoria de trabajo.	35
3.3.3.La respuesta a estrés.	37
4. La respuesta a estrés.	
4.1. El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y su regulación.	38
4.2.Respuesta neuroquímica al estrés.	43
4.3.Efectos conductuales del estrés.	44
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.	48
MATERIALES Y MÉTODOS.	
1.Animales.	53
2.Experimentos de perfusión <i>in vivo</i>.	
2.1.Construcción de implantes.	54
2.2.Construcción de la cánula de microdiálisis.	55
2.3.Cirugía estereotáxica.	57
2.4.Sistema de perfusión intracerebral <i>in vivo</i> .	59
2.5.Protocolo de perfusión y estrés.	61
2.6.Análisis de neurotransmisores por cromatografía líquida de alta resolución	

2.6.1.Detección de catecolaminas.	
2.6.1.1.Condiciones cromatográficas.	62
2.6.1.2.Calibración.	64
2.6.1.3.Cálculo del coeficiente de variación.	64
2.6.1.4.Linealidad del análisis cromatográfico.	64
2.6.2.Detección de acetilcolina y colina.	
2.6.2.1.Condiciones cromatográficas.	65
2.6.2.2.Calibración.	66
2.6.2.3.Cálculo del coeficiente de variación.	66
2.6.2.4.Linealidad del análisis cromatográfico.	67
2.6.3.Detección de glutamato.	
2.6.3.1.Condiciones cromatográficas.	69
2.6.3.2.Calibración.	70
2.6.3.3.Cálculo del coeficiente de variación.	71
2.6.3.4.Linealidad del análisis cromatográfico.	72
2.7. Verificación de la localización de la cánula de microdiálisis.	72
3.Cuantificación de corticosterona mediante radioinmunoensayo.	
3.1.Cuantificación de corticosterona plasmática.	74
3.2.Cuantificación de corticosterona libre en muestras de microdiálisis	76
4.Evaluación de la actividad motora en un ambiente novedoso.	77
5.Evaluación de la memoria de trabajo mediante un laberinto acuático en forma de T.	
5.1.Características generales.	78
5.2.Procedimiento experimental.	79
6.Protocolo experimental.	81
7.Análisis estadístico.	82

RESULTADOS.

1.Efectos del envejecimiento y el EA sobre la liberación de neurotransmisores en la CPF.	
1.1.Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración extracelular de dopamina en la CPF de la rata despierta	
1.1.1 Concentración extracelular basal de dopamina.	84
1.1.2. Concentración extracelular de dopamina en respuesta a estrés agudo.	85
1.2.Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración extracelular de acetilcolina en la CPF de la rata despierta.	
1.2.1.Concentración extracelular basal de acetilcolina	88
1.2.2. Concentración extracelular de acetilcolina en respuesta a estrés agudo.	89
1.3. Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración extracelular de glutamato en la CPF de la rata despierta.	
1.3.1. Concentración extracelular basal de glutamato	92
1.3.2. Concentración extracelular de glutamato en respuesta a estrés agudo.	93
2. Efectos del envejecimiento y del EA sobre conductas asociadas a la CPF.	
2.1. Efectos del envejecimiento y del EA sobre la actividad motora espontánea.	

2.1.1. Actividad motora horizontal.	95
2.1.2. Actividad motora vertical.	98
2.2. Efectos del envejecimiento y del EA sobre la memoria de trabajo.	
2.2.1. Evaluación de la memoria de trabajo en condiciones basales.	101
2.2.2. Evaluación de la memoria de trabajo en condiciones de estrés.	104
3. Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración de CORT.	
3.1. Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración de CORT libre en la CPF de la rata despierta.	
3.1.1. Concentración extracelular basal de CORT libre.	106
3.1.2. Concentración extracelular de CORT libre en respuesta a estrés agudo.	107
3.2. Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración basal de CORT plasmática.	108
3.3. Efecto del envejecimiento sobre la concentración de CORT plasmática y de CORT libre en el cerebro (hipocampo y CPF).	
3.3.1. Concentraciones basales de CORT plasmática total y CORT libre en el cerebro.	109
3.3.2. Concentraciones de CORT plasmática y de CORT libre en el cerebro en respuesta a estrés.	110

DISCUSIÓN.

ACERCA DE LOS MÉTODOS.

1. Perfusión cerebral <i>in vivo</i>	
1.1. Introducción.	113
1.2. Acerca de la microdiálisis: ventajas y variables relevantes.	
1.2.1. Algunos conceptos básicos.	115
1.2.2. Factores que afectan a la recuperación.	116
1.2.3. Factores que afectan a la elección del protocolo de microdiálisis.	118
1.2.4. Acerca de la composición del líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs).	120
1.3. Sobre el significado de las concentraciones de neurotransmisores recogidas mediante la técnica de microdiálisis.	122
1.3.1. Origen de la concentración extracelular de acetilcolina y dopamina.	123
1.3.2. Origen de la concentración extracelular de glutamato.	124
1.4. Sobre el análisis cromatográfico.	125
1.4.1. Sobre el análisis de catecolaminas.	126
1.4.2. Sobre el análisis de acetilcolina.	127
1.4.3. Sobre el análisis de aminoácidos.	128
2. Sobre el modelo de enriquecimiento ambiental.	
2.1. Evaluación crítica del modelo.	
2.1.1. Ambiente natural frente a modelo experimental.	129
2.1.2. ¿Qué grupos controles han de ser empleados?	131
2.2. Variables relevantes del EA y estandarización.	134
2.3. Relevancia del modelo de EA en humanos.	138

2.4. El efecto del envejecimiento en la respuesta a estrés en el ser humano.	141
ACERCA DE LOS RESULTADOS	
1.Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y liberación de dopamina en la corteza prefrontal.	143
2.Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y liberación de acetilcolina en la corteza prefrontal.	146
3.Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y concentraciones extracelulares de glutamato en la corteza prefrontal.	149
4.Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y actividad motora espontánea.	151
5.Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y memoria de trabajo.	154
6. Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y corticosterona en plasma y cerebro.	
6.1.Envejecimiento y corticosterona.	157
6.1.1.Corticosterona plasmática.	157
6.1.2.Corticosterona libre en el cerebro.	158
6.1.3.Relación entre la corticosterona plasmática y la corticosterona libre en el cerebro.	159
6.2.Enriquecimiento ambiental y corticosterona.	
6.2.1.Corticosterona plasmática.	162
6.2.2.Corticosterona libre en la corteza prefrontal.	163
7. Consideraciones finales y generales acerca del enriquecimiento ambiental y sus efectos sobre la respuesta a estrés.	165
CONCLUSIONES.	171
BIBLIOGRAFÍA.	173

ABREVIATURAS.

ACTH: corticotropina (del inglés, *adrenocorticotropic hormone*).

AMP: adenosil monofosfato.

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato.

ARN: ácido ribonucleico.

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, *brain-derived neurotrophic factor*).

CORT: corticosterona.

CPF: corteza prefrontal.

CRH: hormona liberadora de corticotropina (del inglés, *corticotropin releasing hormone*).

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético.

EA: enriquecimiento ambiental.

Glu: glutamato.

GABA: ácido gamma-aminobutírico (del inglés, *gamma-aminobutyric acid*).

GR: receptores de glucocorticoides (tipo II).

HHA: hipotálamo-hipófisis-adrenal.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, *High pressure liquid chromatography*).

HVA: ácido homovanílico (del inglés, *homovanilic acid*)

LCRs: líquido cefalorraquídeo sintético.

L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina.

LTP: potenciación a largo plazo (del inglés, *long-term potentiation*).

mGluR: receptor metabotrópico de glutamato (del inglés, *metabotropic glutamate receptor*).

MR: receptores de mineralocorticoides (tipo I)

NGF: factor de crecimiento neural (del inglés, *nerve growth factor*).

NMDA: N-metil D-aspartato.

n.s.: no significativo.

OPA: O-ftaldehído.

TTX: tetrodotoxina.

INTRODUCCIÓN

1. ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

El ambiente en el que se desarrolla un individuo, así como su estilo de vida pueden condicionar parámetros tan diversos como su expectativa de vida, la aparición de diversas enfermedades psiquiátricas o el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Mohajeri y Leuba 2009; Harrington *et al.*, 2009; Afifi *et al.*, 2010). Es por ello que se han tratado de poner a punto modelos animales con el fin de estudiar cómo el ambiente es capaz de modular la función cerebral para poder finalmente desarrollar tratamientos más centrados en la modificación de las condiciones ambientales o en el desarrollo de fármacos que simulen los efectos de un ambiente favorable. A estos tratamientos se les ha denominado *enviromimetics* (McOmish y Hannan 2007). El modelo animal más empleado a este respecto es el de enriquecimiento ambiental (EA).

El EA consiste en un incremento de los estímulos sociales y sensoriomotores con respecto a las condiciones habituales de los animales de laboratorio. De forma general, las condiciones de EA consisten en la introducción de un número variable de animales (entre 8 y 12) en una jaula de grandes dimensiones que contiene diversos objetos cuya disposición y variedad se modifica periódicamente. Habitualmente se incluyen también ruedas para la realización de ejercicio físico voluntario. Puede considerarse al EA como un modelo para evaluar la plasticidad cerebral, dado que se modifican diversas variables ambientales (número de animales por jaula, dimensiones de la jaula, distribución y diversidad de objetos en la misma) que pueden inducir cambios en ésta (Mora *et al.*, 2007).

Los primeros trabajos realizados con el modelo de EA datan de la década de los 60 del siglo pasado y han continuado hasta la actualidad. Fue Donald Hebb quien, de forma anecdótica, comenzó los trabajos en este campo comparando en una prueba de memoria espacial a ratas de laboratorio con ratas que él tenía en su casa como mascotas. Hebb observó que estas últimas mostraron mejores resultados en dicha prueba de memoria. Después, el grupo de Berkeley dirigido por Mark Rosenzweig estudió en profundidad los efectos del EA sobre la morfología cerebral (Rosenzweig 2003). A partir de entonces, muchos otros grupos de investigación se han centrado en estudio de cómo las condiciones ambientales afectan a muy diversas variables relacionadas con el sistema

nervioso, que aquí reuniremos en tres grandes grupos: efectos neuroanatómicos, neuroquímicos y conductuales del EA.

1.1. Efectos neuroanatómicos del enriquecimiento ambiental.

A nivel neuroanatómico, los primeros cambios mostrados por el grupo de Rosenzweig y Bennett (1996) en animales mantenidos en condiciones de EA, que después han sido confirmados por otros laboratorios (Szeligo y Leblond 1977; Por y Bondy 1982; Black *et al.*, 1989), consistieron en un incremento del volumen de diversas regiones de la corteza cerebral, y este incremento fue dependiente del tiempo de exposición de los animales al EA (Diamond 2001). El incremento en el volumen de la corteza cerebral se ha atribuido posteriormente a un mayor número de dendritas y de contactos sinápticos en las neuronas corticales (Kolb y Whishaw 1998; Leggio *et al.*, 2005; Sale *et al.*, 2009), que también ha sido observado en el hipocampo (Moser *et al.*, 1997; Rampon *et al.*, 2000a). Y, a su vez, este incremento en el número de sinapsis observado en los animales mantenidos en EA ha sido atribuido a una mayor síntesis de factores neurotróficos en la corteza cerebral e hipocampo, como el BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) (Falkenberg *et al.*, 1992; Mora *et al.*, 2007; Sale *et al.*, 2007), o el NGF (*neural growth factor*) (Dahlqvist *et al.*, 1999). Estos mayores niveles de factores neurotróficos podrían explicar asimismo los mayores niveles de neurogénesis, más concretamente en la supervivencia celular, observados en animales mantenidos en EA (Kempermann *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 1999; Segovia *et al.*, 2006). Pero además no sólo se ha encontrado un incremento en el número de nuevas neuronas, sino también en el número de células gliales (Szeligo y Leblond 1977; Diamond 2001; Komitova *et al.*, 2006). Por último, también se ha encontrado un aumento de la angiogénesis en el cerebro de animales mantenidos en EA (Black *et al.*, 1989; Kolb y Whishaw 1998; Ekstrand *et al.*, 2008).

1.2. Efectos neuroquímicos del enriquecimiento ambiental.

A nivel neuroquímico, se han descrito cambios producidos por el EA en varios sistemas de neurotransmisión.

En el sistema dopaminérgico, se ha observado una disminución en la actividad y densidad del transportador de dopamina en la CPF de animales mantenidos en EA

(Neugebauer *et al.*, 2004;Zhu *et al.*, 2005). Más recientemente, este mismo grupo ha mostrado, empleando la técnica de voltametría, que estos cambios en la función del transportador de dopamina son dependientes tanto de la región cerebral estudiada como del estímulo aplicado (Zhu *et al.*, 2007). Así, en condiciones basales la actividad del transportador de dopamina está reducida en la CPF pero no en el estriado de animales mantenidos en EA, pero su actividad se incrementa en respuesta a estímulos que producen una liberación de dopamina en la CPF, como una inyección de nicotina. Se ha sugerido que esta menor funcionalidad de los transportadores de dopamina en los animales mantenidos en EA a nivel basal podría dar lugar a una disminución del metabolismo de este neurotransmisor en la CPF (Zhu *et al.*, 2005). Un trabajo reciente no ha mostrado, sin embargo, diferencias en los niveles basales de dopamina en el estriado entre ratas en condiciones de EA y aislamiento (Brenes *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha descrito una disminución en la densidad de los receptores D1 de dopamina en la CPF de animales mantenidos en EA (Del Arco *et al.*, 2007a). Por último, se ha observado que el EA en gerbos modifica el desarrollo del sistema dopaminérgico, dando lugar a un mayor número de fibras dopaminérgicas en la CPF (Winterfeld *et al.*, 1998).

Con respecto al neurotransmisor acetilcolina, si bien los trabajos al respecto son escasos, los primeros estudios mostraron que el EA producía cambios en algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de este neurotransmisor y, más concretamente, un incremento en los niveles de acetilcolinesterasa y colina acetiltransferasa (Rosenzweig y Bennett 1996). En un artículo en el que se estudiaron más específicamente estos cambios se observó que el EA da lugar a un incremento en la actividad colina acetiltransferasa en el núcleo caudado y que además favorece un incremento en la actividad de esta enzima en el hipocampo y la corteza frontal cuando los animales son entrenados en la prueba del laberinto acuático (Park *et al.*, 1992). Sin embargo otro grupo (Myhrer *et al.*, 1992), empleando un protocolo similar al de Park *et al.* no encontró diferencias en los niveles de actividad de la colina acetil-transferasa en la corteza entorrinal lateral, corteza temporal y corteza frontal. Estos resultados sugieren una mayor síntesis de acetilcolina en el cerebro de los animales mantenidos en EA en ciertas áreas cerebrales, si bien éstos no han sido evaluados de forma directa.

El sistema neurotransmisor más estudiado con relación al EA es el glutamatérgico. Así, uno de los primeros trabajos al respecto mostró un incremento en la actividad del

transportador de alta afinidad de D-aspartato en la corteza entorrinal lateral, pero no en corteza frontal o en corteza temporal (Myhrer *et al.*, 1992). Se ha descrito, sin embargo, un descenso de la expresión del transportador de glutamato EAAC1 en varias subregiones del hipocampo (Andin *et al.*, 2007). Con respecto a los receptores NMDA, se ha observado una mayor expresión de las subunidades NR2A y NR2B en animales mantenidos en EA (Tang *et al.*, 2001). Con respecto a los receptores AMPA, el EA no parece modificar su expresión, pero sí modifica la unión a H³-AMPA (Gagné *et al.*, 1998; Andin *et al.*, 2007), si bien algunos trabajos han mostrado un incremento de la expresión de la subunidad GluR1 (Tang *et al.*, 2001; Mlynarik *et al.*, 2004). Además el EA da lugar a un incremento de la expresión de los receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I en la CPF, así como a una disminución de los monómeros de los receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 2/3 en la CPF (Melendez *et al.*, 2004). A pesar de los cambios descritos, los niveles basales extracelulares de glutamato en el núcleo accumbens y el hipocampo no son diferentes en animales mantenidos en EA excepto en el hipocampo en animales de 25 meses. (Segovia *et al.*, 2006).

Un análisis genético de ratones mantenidos en EA mostró que los efectos sobre la expresión de genes comienzan tan sólo a las 3h de colocar a los animales en esas condiciones, y la mayoría de los genes que ven modificada su expresión (de entre los más de 11000 que se estudiaron) están relacionados con la síntesis y procesamiento de proteínas, así como con la apoptosis, el tráfico de vesículas sinápticas o la excitabilidad neuronal (Rampon *et al.*, 2000b). Otro trabajo ha mostrado recientemente que la activación del gen de activación temprana *c-fos* en diversas áreas cerebrales, entre las que se encuentra la CPF, se produce con tan sólo unas horas de EA (Ali *et al.*, 2009). También se ha observado un incremento en los niveles de proteínas relacionadas con la liberación de neurotransmisores, como la sinaptofisina, en el cerebro de animales mantenidos en EA (Bredy *et al.*, 2004).

1.3. Efectos conductuales del enriquecimiento ambiental.

El EA se ha mostrado en numerosos trabajos como una modificación experimental que incrementa ciertas capacidades cognitivas. Se ha mostrado una mejor memoria espacial de animales mantenidos en condiciones de EA en pruebas como el laberinto radial (Leggio *et al.*, 2005) o el laberinto acuático (*water maze*) (Falkenberg *et al.*,

1992; Kempermann *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 2002) y una mejor memoria de trabajo evaluada en un laberinto T (Melendez *et al.*, 2004). Además, los animales mantenidos en EA muestran una mejor memoria emocional, evaluada en una prueba de condicionamiento al miedo (Rampon *et al.*, 2000a; Lee *et al.*, 2003; Barbelivien *et al.*, 2006). En relación con estos resultados se encuentran algunos hallazgos neurofisiológicos que muestran una potenciación a largo plazo más duradera en animales en condiciones estándar que en condiciones de aislamiento (Lu *et al.*, 2003).

En cuanto a la actividad motora espontánea, los animales mantenidos en EA muestran una habituación más rápida en la prueba del campo abierto que animales en condiciones control (Zimmermann *et al.*, 2001; Schrijver *et al.*, 2002; Elliott y Grunberg 2005; Del Arco *et al.*, 2007b; Green *et al.*, 2010) y se ha sugerido que este cambio está relacionado con una mayor capacidad exploratoria de estos animales. De hecho, los animales mantenidos en EA muestran mayores niveles de exploración de un objeto novedoso inicialmente, pero la caída en la actividad exploratoria del mismo se reduce más rápidamente que en el caso de animales control, lo que sugiere de nuevo una mayor eficacia exploratoria en los primeros (Zimmermann *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Además, ciertas respuestas como la hiperlocomoción inducida por diferentes drogas psicoestimulantes se encuentra atenuada en los animales mantenidos en EA (Bardo *et al.*, 1995; Green *et al.*, 2003). Asimismo se ha mostrado una menor tendencia a la autoadministración de cocaína de animales mantenidos en EA (Solinas *et al.*, 2008; Chauvet *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2010) así como menores niveles de impulsividad, parámetro este último que se ha relacionado estrechamente con la adicción a drogas (Wood *et al.*, 2006; Dalley *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2008).

1.4. Efectos protectores y reparadores del enriquecimiento ambiental.

Numerosos trabajos se han centrado en el estudio de los posibles efectos protectores del EA frente al envejecimiento normal o patológico (enfermedades neurodegenerativas principalmente), mientras que otros lo han hecho sobre el papel reparador del EA una vez que se ha producido algún tipo de lesión en el individuo. Estos efectos del EA se ha propuesto que podrían explicarse mediante la hipótesis de la reserva cognitiva (Stern 2009). Esta hipótesis propone que tanto la herencia genética como un ambiente favorable de estimulación cognitiva pueden dar lugar a una menor vulnerabilidad del

cerebro frente a procesos no patológicos, como el envejecimiento, o patológicos, como la aparición de enfermedades neurodegenerativas, o incluso ante los daños producidos por sustancias neurotóxicas o por isquemia (Laviola *et al.*, 2008; Stern 2009; Nithianantharajah y Hannan 2009)

En cuanto al efecto protector del EA frente al envejecimiento patológico, algunos estudios han descrito una reducción de los síntomas conductuales, aunque no siempre de los neuropatológicos, en modelos de enfermedad de Huntington, Alzheimer o Parkinson en aquellos animales mantenidos en condiciones de EA (Li y Tang, 2005; Nithianantharajah y Hannan 2006; Mahncke *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que tanto el EA como el envejecimiento ejercen sus efectos sobre el cerebro gracias al fenómeno conocido como plasticidad cerebral. La plasticidad cerebral se puede definir como una capacidad del organismo presente durante toda la vida que permite cambios físicos y funcionales del cerebro, que se presenta tanto en humanos como en otros animales y que es inherentemente bidireccional: a partir de los mismos mecanismos la función cerebral puede, bien ser incrementada, bien ser degradada, dependiendo de las circunstancias (Mahncke *et al.*, 2006).

Se han descrito algunos cambios relacionados con la plasticidad cerebral en animales viejos mantenidos en EA. Estos animales presentan un mayor número de sinapsis y mayores niveles de sinaptofisina, proteína involucrada en la liberación de los distintos neurotransmisores y empleada como parámetro de plasticidad cerebral (Greenough *et al.*, 1986; Saito *et al.*, 1994; Frick y Fernandez 2003; Leal-Galicia *et al.*, 2008). También se ha mostrado un incremento en la densidad de espinas dendríticas (Kolb *et al.*, 2003). Algunos trabajos, sin embargo, sugieren que la eficacia del EA sobre la estimulación de la dendritogénesis en animales viejos es menor que en el cerebro del animal adulto (Black *et al.*, 1989). Por otro lado, el EA incrementa la neurogénesis en el giro dentado de animales viejos aun cuando este incremento es menor que en animales adultos (Kempermann *et al.*, 1998; Segovia *et al.*, 2006). No se ha observado, sin embargo, un efecto importante del EA sobre la angiogénesis en animales viejos mantenidos en EA (Black *et al.*, 1989). Sin embargo, los cambios producidos por el envejecimiento sobre la gliogénesis sí se ven revertidos por el EA (Soffié *et al.*, 1999).

En cuanto a cambios neuroquímicos producidos por el EA en animales viejos, si bien han sido poco estudiados, se ha mostrado que el EA produce un incremento en los niveles de colina acetil-transferasa en todos los núcleos colinérgicos y de GSH, implicada esta última en la eliminación de radicales libres (Fernández *et al.*, 2004; Harati *et al.*, 2009). Se ha mostrado además que el EA da lugar a una mayor concentración extracelular de glutamato tanto basal como producida por un estímulo despolarizante en la región CA3 de hipocampo (Segovia *et al.*, 2006)

La relación entre EA y envejecimiento se ha estudiado especialmente a nivel conductual, lo que permite inferir el estado cognitivo del animal. Varios estados han descrito una mejor memoria espacial y de trabajo (Frick y Fernandez 2003; Fernández *et al.*, 2004; Segovia *et al.*, 2006; Lores-Arnaiz *et al.*, 2006; Harburger *et al.*, 2007; Harati *et al.*, 2009), así como una mejor memoria de reconocimiento de objetos (Leal-Galicia *et al.*, 2007) en animales viejos mantenidos en condiciones de EA que en animales mantenidos en condiciones estándar. El EA, sin embargo, no parece modificar la actividad motora en animales viejos, pero sí protege frente a los déficits asociados a la edad en la realización de una tarea que evalúa la atención selectiva (Harati *et al.*, 2009).

Por último, en cuanto a los efectos reparadores del EA, se ha descrito una mejor recuperación tanto a nivel conductual como en ciertos parámetros bioquímicos, de animales mantenidos en EA frente a diversas manipulaciones, como la oclusión de las arterias cerebrales (Dahlqvist *et al.*, 1999), lesiones de neuronas colinérgicas o dopaminérgicas (Mahncke *et al.*, 2006; Petrosini *et al.*, 2009), anoxia postnatal (Iuvone *et al.*, 1996), ambliopía (Sale *et al.*, 2007), separación materna (Francis *et al.*, 2002), o incluso frente a ciertas alteraciones conductuales observadas en modelos *knockout* (Rampon *et al.*, 2000a).

2. ENVEJECIMIENTO.

Tanto la edad media como la esperanza de vida media se han incrementado en las sociedades occidentales en las últimas décadas, lo que ha dado lugar a una mayor incidencia de enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Bishop *et al.*, 2010). De hecho, para la mitad del presente siglo se espera que un tercio de la población mundial supere los 60 años y que se incremente considerablemente la población de más de 80 años (Lutz *et al.*, 2008). Esto ha dado lugar a un mayor interés por el estudio de aquellos factores que puedan atenuar, retrasar o incluso revertir los efectos del envejecimiento sobre el cerebro. En esta línea, algunos trabajos epidemiológicos han relacionado tanto unos mayores niveles de educación, como la realización de tareas con alta demanda cognitiva a lo largo de la vida, así como la práctica habitual de ejercicio físico, con una menor incidencia de demencias o de déficits cognitivos asociados con la edad (Milgram *et al.*, 2006; Stern 2009).

El envejecimiento puede definirse como una pérdida progresiva de funciones motoras sensoriales y cognitivas que son consecuencia de los cambios degenerativos que tienen lugar con la edad (Mora y Porras 1998). Este es, por tanto, un proceso fisiológico normal, y no una acumulación de patologías. Los cambios producidos por el envejecimiento son consecuencia de la interacción compleja entre la expresión de diversos genes y el ambiente en el que se desarrollan dichos genes. Así, si bien diversos análisis genéticos funcionales han mostrado que existen reguladores maestros del envejecimiento y de la esperanza de vida que se conservan en diversas especies animales, el análisis de estos modelos muestra que la tasa de envejecimiento no es fija, sino que es plástica y está abierta a modificación (Bishop *et al.*, 2010). Por este motivo se ha sugerido que sería posible retrasar e incluso atenuar los cambios que produce el envejecimiento sobre diversos sistemas fisiológicos, y más concretamente, sobre el sistema nervioso, mediante la modificación del ambiente (Finch 1993; Mora y Porras 1998; Mahncke *et al.*, 2006; Rajah *et al.*, 2009).

El envejecimiento produce una serie de cambios en la estructura y función del sistema nervioso, que se detallan a continuación.

2.1. Efectos neuroanatómicos del envejecimiento.

Al contrario de los que se pensó inicialmente, no hay una pérdida significativa de neuronas en el cerebro envejecido, ni esta pérdida es generalizada en roedores y humanos (Coleman y Flood 1986;Haug y Eggers 1991;Morrison y Hof 1997). En un primer trabajo, que cuestionaba los resultados previos que mostraban pérdida de neuronas con la edad, se sugería, de hecho, que no había una pérdida significativa de neuronas piramidales en la corteza cerebral y, más específicamente, en la corteza frontal durante el proceso de envejecimiento normal (Braak y Braak 1986). Posteriormente se ha mostrado que incluso las ratas viejas que muestran déficits cognitivos no presentan pérdidas significativas de neuronas en el hipocampo (Rasmussen *et al.*, 1996;Rapp y Gallagher 1996). Además, se ha observado que los cambios asociados a la edad que acontecen en el cerebro no son generalizados, sino que tienen lugar de forma diferencial en función del área cerebral estudiada (Haug y Eggers 1991;Mora *et al.*, 2007). Resultados similares se han obtenido analizando el cerebro humano durante el envejecimiento (West 1993;Mora *et al.*, 2007;Morrison y Hof 1997).

Se ha mostrado también una reducción en el volumen de materia gris en el cerebro envejecido, que condujo a la sugerencia de que tenía lugar una hipotrofia neuronal con la edad que podría ser la causa de los déficits cognitivos y motores asociados a la edad (Coleman y Flood 1986;Greenough *et al.*, 1986;Haug y Eggers 1991;Finch 1993). Sin embargo, algunos estudios posteriores mostraron que, salvo en la CPF, la arborización dendrítica parece mantenerse con el envejecimiento en la corteza cerebral y el hipocampo (Burke y Barnes 2006). Además se ha observado que ciertas neuronas envejecidas presentan hipertrofia del árbol dendrítico en las etapas tempranas del envejecimiento (Finch 1993;Mora y Porras 1998). Por estos motivos se ha sugerido que la pérdida de volumen de materia gris podría ser debida a una reducción en el número de espinas dendríticas, que podría ser especialmente importante en el caso de la CPF (Terry y Katzman 2001;Hedden y Gabrieli 2004).

Los cambios en la arborización dendrítica del cerebro envejecido muestran que éste mantiene aún cierta plasticidad, aunque se cree que reducida con respecto al cerebro adulto (Rosenzweig 2003). Esta reducción de la plasticidad podría ser debida a la menor expresión de factores neurotróficos, como el BDNF, que se ha observado en el

hipocampo de ratas envejecidas (Smith y Cizza 1996; Hayashi *et al.*, 2001) y que podría explicar parte de los déficits cognitivos asociados a la edad (Gooney *et al.*, 2004). Además, por otro lado, el cerebro envejecido es capaz de generar nuevas neuronas, si bien la proliferación de estas nuevas neuronas es menor que en el cerebro joven, al menos en lo que respecta al giro dentado del hipocampo (Kuhn *et al.*, 1996; Segovia *et al.*, 2006).

El cerebro envejecido presenta, además, gránulos de lipofucsina, hiperactividad astrocitaria y, en algunas especies, aunque no en roedores, el cerebro envejecido presenta ovillos neurofibrilares y placas amiloides (Mora y Porras 1998). En cuanto al sistema vascular, el envejecimiento reduce la densidad de arteriolas y capilares corticales en la rata (Finch 1993).

2.2. Efectos neuroquímicos del envejecimiento.

El envejecimiento modifica diversos sistemas de neurotransmisión (Meites 1988; Sarter y Bruno 1998; Segovia *et al.*, 2001; Mora *et al.*, 2008). Nos centraremos a continuación en los sistemas dopaminérgico, colinérgico y glutamatérgico, por ser objeto de estudio en el presente trabajo de investigación.

2.2.1. Efectos del envejecimiento sobre el sistema dopaminérgico.

El efecto del envejecimiento sobre el sistema dopaminérgico se ha estudiado en profundidad, pero sobre todo en la vía mesoestriatal, por su relevancia en la enfermedad de Parkinson. El efecto del envejecimiento sobre la vía mesocortical dopaminérgica ha sido menos estudiado y aquellos trabajos publicados al respecto muestran resultados contradictorios.

En cuanto a la vía mesoestriatal dopaminérgica, se ha descrito una reducción de los receptores D1 y D2 y del transportador de dopamina en el estriado, no sólo en roedores, sino también en primates y humanos (Morelli *et al.*, 1990; Valerio *et al.*, 1994; Bäckman *et al.*, 2006). Estos cambios, sin embargo, no parecen ser tan claros en roedores en la vía mesocortical y más concretamente en la corteza frontal (Morelli *et al.*, 1991; Valerio *et al.*, 1994), si bien en humanos esta caída parece ser más clara en lo que respecta a

ciertos marcadores dopaminérgicos (Bäckman *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha mostrado que el envejecimiento produce cambios en el acoplamiento de la enzima adenilato ciclasa con los receptores D1 y D2 de dopamina en la corteza frontal, lo que es índice de un cambio en la actividad de los receptores dopaminérgicos en esta área cerebral con la edad (Barili *et al.*, 1998).

Otro parámetro muy estudiado en relación con el sistema dopaminérgico es la concentración de dopamina y sus metabolitos, fundamentalmente en tejido. De nuevo, mientras que en estriado se acepta que hay una caída clara de la dopamina y sus metabolitos con la edad (Godefroy *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994; Tanila *et al.*, 1994; Míguez *et al.*, 1999), en la CPF y la corteza frontal se han descrito menores niveles (Luine *et al.*, 1990; Miura *et al.*, 2002), ausencia de cambios (Goudsmit *et al.*, 1990; Godefroy *et al.*, 1991; Tanila *et al.*, 1994) o incluso un incremento en los niveles de dopamina con el envejecimiento (Venero *et al.*, 1993). En otro trabajo, sólo las ratas viejas con déficits cognitivos presentaban una reducción de los niveles de dopamina en la CPF (Lee *et al.*, 1994).

Los trabajos que han empleado la técnica de microdiálisis han mostrado, o bien una reducción (Gerhardt y Maloney 1999) o bien ausencia de cambios (Kametani *et al.*, 1995; Stanford *et al.*, 2001) en la liberación basal de dopamina en el estriado de ratas viejas. En la CPF se ha mostrado una reducción, aunque no muy acusada, de los niveles basales de dopamina (Del Arco *et al.*, 2001a; Mizoguchi *et al.*, 2009b). En cuanto a la liberación de dopamina estimulada por agentes despolarizantes, en el estriado se ha mostrado que tanto altas dosis de potasio como la D-anfetamina producen menores incrementos de dopamina en el estriado de animales envejecidos (Kametani *et al.*, 1995; Gerhardt y Maloney 1999; Stanford *et al.*, 2000; Purdom *et al.*, 2003). En el caso de la CPF, los trabajos escasos. Se ha mostrado que el envejecimiento reduce la liberación de dopamina en la CPF producida tanto por estrés como por altas concentraciones de potasio (Del Arco *et al.*, 2001a; Mizoguchi *et al.*, 2009b).

Existen, además, algunos datos conductuales y farmacológicos que sugieren que la función dopaminérgica en la CPF podría verse afectada con la edad. Así, se ha descrito un déficit en la memoria de trabajo asociado a la edad, cuya causa primaria podría ser algún cambio en el sistema dopaminérgico prefrontal (Braver y Barch 2002; Bäckman *et*

al., 2006;Hains y Arnsten 2008) y, de hecho, se ha mostrado que la inyección local de agonistas de los receptores D1 en la CPF atenúa esos déficits tanto en ratas como en monos (Cai y Arnsten 1997;Castner y Goldman-Rakic 2004;Mizoguchi *et al.*, 2009b).

2.2.2. Efectos del envejecimiento sobre el sistema colinérgico.

La propuesta de la “hipótesis colinérgica de la disfunción geriátrica de la memoria” de Bartus *et al* (1982), así como los trabajos que relacionaban la enfermedad de Alzheimer con una degeneración de las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert, impulsaron el estudio del sistema colinérgico en animales envejecidos en busca de cambios en este sistema que aconteciesen con la edad. La hipótesis de Bartus *et al.* proponía que los déficits cognitivos asociados al envejecimiento estaban relacionados con cambios en el sistema colinérgico, que daban lugar a una disfunción de este sistema asociada a la edad. Sin embargo, desde entonces, los efectos del envejecimiento sobre el sistema colinérgico, y más concretamente, sobre los núcleos del prosencéfalo basal, han sido objeto de debate, e incluso algunos autores han puesto en duda la hipótesis colinérgica (Decker 1987;Sarter y Bruno 1998;Morris 2002; pero ver Bartus 2000).

Algunos trabajos mostraron una reducción en el número de neuronas que expresan colina-acetil transferasa y del receptor para NGF en el núcleo basal magnocelular, séptum medial y la banda diagonal de Broca, y además estos cambios se correlacionaban con los déficit en la ejecución de los animales viejos de un laberinto acuático (Fischer *et al.*, 1991;Fischer *et al.*, 1992;Stemmelin *et al.*, 2000). Sin embargo, el rápido incremento del número de trabajos y la mejora de las técnicas estereológicas condujo a la conclusión que no hay una pérdida significativa de neuronas colinérgicas con el envejecimiento (Decker 1987;Finch 1993;Sarter y Bruno 1998;Schliebs y Arendt 2006), aunque sí se ha observado atrofia en estas células, que podría ser la causante de la reducción en la expresión de colina-acetil transferasa y en el receptor para NGF. De hecho, algunos autores proponen que, con el envejecimiento, las neuronas colinérgicas se tornan más vulnerables y atroficas debido, al menos en parte, a una caída en los niveles de NGF (Finch 1993;Schliebs y Arendt 2006). Por otro lado, se comenzaron a dilucidar las funciones de la acetilcolina en el cerebro, sobre todo mediante estudios de lesiones empleando agentes neurotóxicos selectivos, y se propuso que la acetilcolina estaba implicada en la regulación del flujo sanguíneo o el sueño, y principalmente en los

procesos atencionales, pero no parecía jugar un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria, al menos de forma directa (Dunnett *et al.*, 1991; Wenk 1997; Baxter y Chiba 1999). Sin embargo, se ha propuesto que este neurotransmisor podría jugar un papel regulador de la memoria mediante su interacción con otros sistemas de neurotransmisión (Decker y McGaugh 1991; Stemmelin *et al.*, 2000).

Sumado a estas evidencias previas, el empleo de la técnica de microdiálisis permitió medir la liberación de acetilcolina *in vivo* en animales viejos. Varios trabajos han mostrado que tanto la liberación basal de acetilcolina como los incrementos de la misma producidos en diversas áreas del cerebro por diversos estímulos no son diferentes entre animales jóvenes y viejos (Kurosawa *et al.*, 1989a; Fischer *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1996; Herzog *et al.*, 2003). Estos trabajos sugieren que la capacidad del sistema colinérgico del prosencéfalo basal de responder a diversos estímulos no se ve afectada de forma significativa con la edad. Sin embargo, se han descrito efectos del envejecimiento sobre algunos marcadores colinérgicos, como es una reducción de la expresión de los receptores muscarínicos en corteza cerebral, hipocampo o estriado (Strong *et al.*, 1986; Decker 1987; Bartus 2000). Además, algunos trabajos han mostrado una menor respuesta del sistema colinérgico en animales viejos a la perfusión local de altas dosis de potasio en corteza frontal y frontoparietal (Moore *et al.*, 1996; Herzog *et al.*, 2003).

Existen pocos trabajos que hayan estudiado la respuesta a estrés del sistema colinérgico con el envejecimiento. Fischer *et al.* (1991), mostraron que el incremento de acetilcolina producido por manipulación del animal (*handling*) en hipocampo no difiere entre animales jóvenes y viejos, mientras que Mizuno y Kimura, (Mizuno y Kimura 1997) mostraron una menor respuesta colinérgica a la restricción del movimiento de los animales viejos en esta misma área cerebral.

2.2.3. Efectos del envejecimiento sobre el sistema glutamatérgico.

Dado el papel eminentemente excitador y su localización ubicua en el sistema nervioso central, se han estudiado con detalle los efectos del envejecimiento sobre este sistema a nivel neuroanatómico, de su actividad en condiciones basales o estimuladas, y de la

expresión de receptores tanto pre- como postsinápticos (para una revisión detallada, ver Segovia et al., 2001).

Los primeros efectos del envejecimiento sobre el sistema glutamatérgico que se observaron se centraron en estudios neuroanatómicos que mostraban atrofia del árbol dendrítico de neuronas piramidales corticales, lo que conducía a una pérdida de sinapsis y espinas dendríticas (Segovia *et al.*, 2001; Majdi *et al.*, 2009). Estos hallazgos no aportaban, sin embargo, datos acerca del sistema glutamatérgico en sí. Algunos trabajos posteriores evaluaron el contenido de glutamato en diversas regiones del cerebro y si sus niveles se veían afectados por el envejecimiento. Así, se ha descrito una disminución en los niveles de glutamato con la edad en la corteza cerebral completa, en la CPF, en la corteza frontal o en el hipocampo (Segovia *et al.*, 2001). Un artículo reciente ha mostrado una disminución en los niveles de glutamato en la CPF, pero no en distintas regiones del hipocampo (Liu *et al.*, 2009). Los niveles de glutamato en tejido no aportan información sobre si la disminución de los niveles se produce en una fracción determinada del glutamato (por ejemplo, en la fracción del glutamato que se encuentra almacenado en vesículas sinápticas). Estos resultados no informan, por tanto, sobre la liberación de glutamato, o sobre sus acciones pre- y post-sinápticas.

Se ha evaluado, mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*, el efecto del envejecimiento sobre la liberación basal de glutamato en diversas regiones del cerebro. En general, no se observan efectos del envejecimiento sobre la liberación basal de glutamato y este resultado es independiente del área cerebral y de la especie o cepa empleados (Segovia *et al.*, 2001). Estos mismos resultados han sido obtenidos en CPF, estriado, núcleo accumbens e hipocampo (Cobo *et al.*, 1993; Segovia *et al.*, 2006).

La liberación estimulada de glutamato tampoco parece verse muy afectada por el envejecimiento. La mayoría de los estudios no han mostrado cambios con la edad de la liberación de glutamato en diversas áreas cerebrales, entre ellas la CPF, el hipocampo o el estriado, en respuesta a estímulos como una alta concentración de potasio o a 4-aminopiridina (Segovia y Mora 2001). Sin embargo, se ha observado que la estimulación eléctrica de la CPF a una intensidad que produce un incremento de glutamato en animales jóvenes no produce este incremento de glutamato en animales viejos (Cobo *et al.*, 1993).

Las concentraciones extracelulares de glutamato dependen, no sólo de la liberación, sino también del transporte de glutamato, que es el principal mecanismo de inactivación del glutamato. Se ha descrito una reducción en el transporte de glutamato en la corteza cerebral y el estriado, pero éste no parece tan importante en el hipocampo (Segovia *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando se toma en cuenta el componente glial, que es el que desempeña fundamentalmente la función de recaptura del glutamato presente en la sinapsis, se ha visto que el transporte no se ve afectado con la edad (Dawson, Jr. *et al.*, 1989).

Posiblemente el cambio más consistente del sistema glutamatérgico con la edad es el que concierne a la expresión de receptores NMDA. Varios trabajos han descrito una disminución en la expresión tanto de ARN mensajero como de la proteína de diferentes subunidades de los receptores NMDA, o en los sitios de unión para los mismos, en diversas áreas cerebrales, como son la CPF, el hipocampo o el estriado (Magnusson y Cotman 1993a; Magnusson 1998; Segovia *et al.*, 2001). Se ha descrito además menores respuestas con la edad en la vía del inositol fosfato y una menor liberación de dopamina en el hipocampo inducida por activación de receptores NMDA (Gonzales *et al.*, 1991). También se ha mostrado una menor actividad de la vía de la adenilato ciclasa con la edad, la cual se activa en respuesta a la unión del glutamato a los receptores NMDA (Araki *et al.*, 1995). Algún trabajo no ha mostrado, sin embargo, cambios en expresión de las subunidades NR1 o NR2A/B con la edad en la CPF, hipocampo o estriado (Majdi *et al.*, 2009).

En cuanto a la expresión de otros receptores glutamatérgicos, los receptores AMPA no cambian con la edad en corteza frontal, pero sí en algunas subregiones del hipocampo (Magnusson y Cotman 1993b). Recientemente, sin embargo, se ha observado una reducción de la subunidad GluR2 en la CPF (Majdi *et al.*, 2009). Los receptores de kainato, tampoco parecen verse afectados por la edad en corteza frontal o hipocampo (Magnusson y Cotman 1993b; Magnusson 1998). Por último, se ha descrito un incremento con la edad de la expresión de los receptores metabotrópicos 1, 2 y 3 en la corteza frontal, hipocampo y estriado de animales viejos (Simonyi *et al.*, 2005). Asimismo, se ha mostrado que la perfusión local de un agonista de estos receptores (ACPD) en la CPF produce una menor liberación de GABA en esta misma área cerebral en animales viejos (Segovia y Mora 2005).

2.3. Efectos del envejecimiento sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

El envejecimiento se ha definido como la pérdida en la capacidad para mantener la homeostasis del organismo (Everitt y Meites 1989). Dado que el estrés supone además una amenaza sobre la homeostasis del organismo, pronto se trató de relacionar ambos conceptos entre sí. Así, del estudio de la relación entre la respuesta a estrés y el envejecimiento, surgió la “hipótesis de la cascada de glucocorticoides” (Sapolsky *et al.*, 1986), que se centraba en el hipocampo envejecido y su relación con el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). Esta hipótesis sugiere que ciertos cambios asociados a la edad en la regulación del eje HHA producen neurotoxicidad y muerte neuronal en el hipocampo dando lugar, como consecuencia de ello, a una hipersecreción de CORT en las ratas viejas, debida al papel regulador del hipocampo sobre la actividad del eje HHA (Sapolsky *et al.*, 1984; Herman *et al.*, 1989; Jacobson y Sapolsky 1991). Además, estos cambios en la anatomía y función del hipocampo explicarían los déficits cognitivos asociados a la edad. La “hipótesis de la cascada de glucocorticoides” asume, de hecho, que los mayores incrementos de CORT plasmática en respuesta a estrés observados en los animales viejos dan lugar a una mayor elevación de los niveles de CORT libre en el cerebro, facilitando de ese modo la neurotoxicidad sobre áreas sensibles a la CORT y que participan en distintos procesos cognitivos, como el hipocampo y la CPF (Squire y Zola-Morgan 1988; Robbins y Roberts 2007).

Las evidencias que apoyan esta hipótesis son numerosas. Las ratas viejas muestran una más lenta recuperación de los niveles basales de CORT plasmática tras un estímulo estresante (Sapolsky *et al.*, 1984; Lorens *et al.*, 1990; van Eekelen *et al.*, 1992; Segar *et al.*, 2009). Por otro lado, y de forma interesante, esos mayores niveles de CORT en las ratas viejas se correlacionan de forma positiva con los cambios asociados a la edad en el hipocampo de ratas dañadas cognitivamente (*cognitively impaired*) (Issa *et al.*, 1990; Nichols *et al.*, 2001; Bizon *et al.*, 2001). Otros trabajos han mostrado que la CORT altera la estructura y funcionalidad del hipocampo (Landfield y Lynch 1978; Hibberd *et al.*, 2000; Herbert *et al.*, 2006) y aunque en un principio se creyó que producía muerte celular en el hipocampo, hoy se cree que estos cambios estructurales y funcionales están más relacionados con alteraciones en los árboles dendríticos y espinas de las neuronas hipocampales (Sousa *et al.*, 1998; Hibberd *et al.*, 2000; McEwen 2000; Herbert *et al.*, 2006). Sin embargo, sí se ha mostrado una modulación de la CORT sobre la

neurogénesis en el hipocampo (Cameron y Gould 1994;Kim y Diamond 2002;Mirescu y Gould 2006). Por último, también se ha observado que la lesión del hipocampo produce hipersecreción de CORT en respuesta a un estímulo estresante (Magariños *et al.*, 1987;Herman *et al.*, 1989).

La CPF no puede excluirse de la “hipótesis de la cascada de glucocorticoides” por varios motivos. En primer lugar, porque esta área cerebral presenta, al igual que el hipocampo, una alta densidad de receptores para glucocorticoides de tipo GR (Reul y de Kloet 1985;Meaney y Aitken 1985;McEwen *et al.*, 1986). También se ha mostrado que la CORT produce alteraciones en la estructura y funcionalidad de la CPF sin producir muerte celular (Cerqueira *et al.*, 2007) y que las lesiones de esta área cerebral producen hipersecreción de CORT tras una situación de estrés (Diorio *et al.*, 1993;Brake *et al.*, 2000;Radley *et al.*, 2006). Por tanto, la CPF podría sufrir cambios durante el envejecimiento junto al hipocampo que condujesen a la alteración de la regulación del eje HHA, dando lugar a hipersecreción de CORT en respuesta a estrés y posterior daño sobre la CPF y el hipocampo, contribuyendo, de ese modo a la “cascada de glucocorticoides”. Algunos trabajos han mostrado además una reducción en la densidad de GRs tanto en la CPF como en el HC de animales viejos que podría contribuir a los problemas en la regulación del eje HHA por parte de las ratas viejas. (van Eekelen *et al.*, 1992;Bizon *et al.*, 2001;Mizoguchi *et al.*, 2009a).

La hipótesis de la “cascada de glucocorticoides” ha sido modificada con el tiempo debido a ciertas inconsistencias entre la propuesta teórica y los datos experimentales y ha pasado a denominarse “hipótesis de la neurotoxicidad”. Ésta propone que la exposición prolongada a glucocorticoides reduce la capacidad de las neuronas de hacer frente a diversos ataques, incrementando la tasa de daño sobre éstas por otras sustancias tóxicas o por el desgaste ordinario. Esta hipótesis, por tanto, concede más importancia a los niveles basales de CORT que a los incrementos de CORT producidos en respuesta a estrés (Sapolsky 1999;Conrad, 2008;Lupien *et al.*, 2009).

2.4. Efectos conductuales del envejecimiento.

Son numerosos los artículos dedicados a estudiar los efectos del envejecimiento sobre diversos parámetros conductuales. Se han estudiado parámetros tan variados como la actividad motora, la memoria espacial, la memoria de trabajo o la atención, y en casi todos los casos se ha mostrado un efecto negativo del envejecimiento sobre éstos.

La actividad motora en un ambiente novedoso es menor en animales viejos que en animales jóvenes, lo que se ha sugerido que es análogo a la bradiquinesia en humanos de avanzada edad (Nyakas *et al.*, 1992;Huang *et al.*, 1995;Crawford y Levine 1997;Yurek *et al.*, 1998). Algunos autores discrepan de esta idea generalizada y proponen la hipótesis alternativa de que los animales viejos mostrarían un menor interés por los ambientes novedosos, que se traduciría en una menor exploración de dichos ambientes (Salchner *et al.*, 2004;Hunt *et al.*, 2009).

La memoria espacial puede evaluarse mediante el empleo de diversas pruebas, entre las que se encuentran el laberinto acuático de Morris (*water maze*) o el laberinto radial. Numerosos artículos han mostrado una menor capacidad de aprendizaje y realización de estas tareas en animales viejos (Kikusui *et al.*, 1999;Shukitt-Hale *et al.*, 2004;Lores-Arnaiz *et al.*, 2006;Jacobson *et al.*, 2008). Asimismo, otros trabajos han mostrado que la memoria de trabajo, evaluada mediante un laberinto radial o en forma de T en el caso de ratas, o mediante una prueba que requiere movimientos sacádicos de los ojos en monos, se encuentra reducida en animales viejos (Tanila *et al.*, 1994;Cai y Arnsten 1997;Bimonte *et al.*, 2003;Castner y Goldman-Rakic 2004;Jacobson *et al.*, 2008;Mizoguchi *et al.*, 2009b). También se han mostrado efectos negativos del envejecimiento sobre pruebas que evalúan la atención (Harati *et al.*,2009).

Una cuestión interesante en los estudios de conducta en relación con el envejecimiento está en separar aquellos animales viejos que no muestran déficits cognitivos de aquellos que sí los muestran. El laberinto acuático de Morris permite llevar a cabo esta separación, aunque el número de animales necesarios en estos estudios es bastante alto (en torno a 100), motivo por el que, aunque sería deseable realizar esta separación, no siempre es posible. Aún así, aquellos estudios que han realizado esta separación entre animales viejos “dañados cognitivamente” frente a “no dañados cognitivamente”, ha

permitido relacionar a los primeros con una pérdida de marcadores colinérgicos (Fischer *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994; Stemmelin *et al.*, 2000) dopaminérgicos (Lee *et al.*, 1994) o con cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Issa *et al.*, 1990). Pero también ha servido para mostrar que no existe una caída en el número de neuronas en hipocampo con la edad, incluso en ratas que muestran daño cognitivo (Rasmussen *et al.*, 1996; Rapp y Gallagher 1996).

3. LA CORTEZA PREFRONTAL.

3.1. Estructura neuroanatómica de la corteza prefrontal.

La corteza prefrontal (CPF) es la región cortical más anterior del lóbulo frontal del cerebro de mamíferos (Fuster 1997). Esta área es la que ha alcanzado un desarrollo filogenético más tardío en el ser humano, con un volumen relativo superior a cualquier otra especie (Preuss 1995). Es por ello que se ha discutido ampliamente acerca de la homología entre las distintas regiones que se han diferenciado en la CPF en roedores y primates (Preuss 1995; Brown y Bowman 2002; Uylings *et al.*, 2003). No obstante, parece haberse llegado al consenso de que, a pesar de que en los primates las funciones en las que se ve involucrada la CPF puedan ser más amplias que en el caso de roedores, la CPF de estos últimos presenta homología con la CPF de los primeros (Uylings *et al.*, 2003). Así, la definición más aceptada para la CPF tanto en roedores como en primates es que ésta es la región cerebral que recibe aferencias recíprocas del núcleo mediodorsal talámico, una característica anatómica presente en todos los mamíferos (Fuster 1997).

Estudios anatómicos, neuroquímicos y de las conexiones recíprocas entre la CPF y otras áreas cerebrales han permitido diferenciar las siguientes regiones en la CPF (Leonard 1969; Leonard 1972; Dalley *et al.*, 2004), que se muestran en la Figura 1:

- Frontal medial: es la mayor porción de la pared medial, anterior y posterior a la rodilla del cuerpo calloso, y a su vez se divide en:
 - Región dorsal: formada por las cortezas precentral y cingulada anterior.
 - Región ventral: formada por las cortezas prelímbica, infralímbica y orbital medial.
- Lateral: formada por las cortezas insular agranular ventral, insular agranular dorsal y orbital lateral.
- Ventral: formada por las cortezas orbital ventral y orbital ventral lateral.

Cada una de estas subregiones de la CPF presenta funciones asociadas diferentes que vienen determinadas por sus conexiones con otras áreas cerebrales o incluso con otras de la propia CPF (Dalley *et al.*, 2004). El presente trabajo de investigación se centró en las regiones prelímbica e infralímbica, por ser las más relacionadas con la respuesta a estrés.

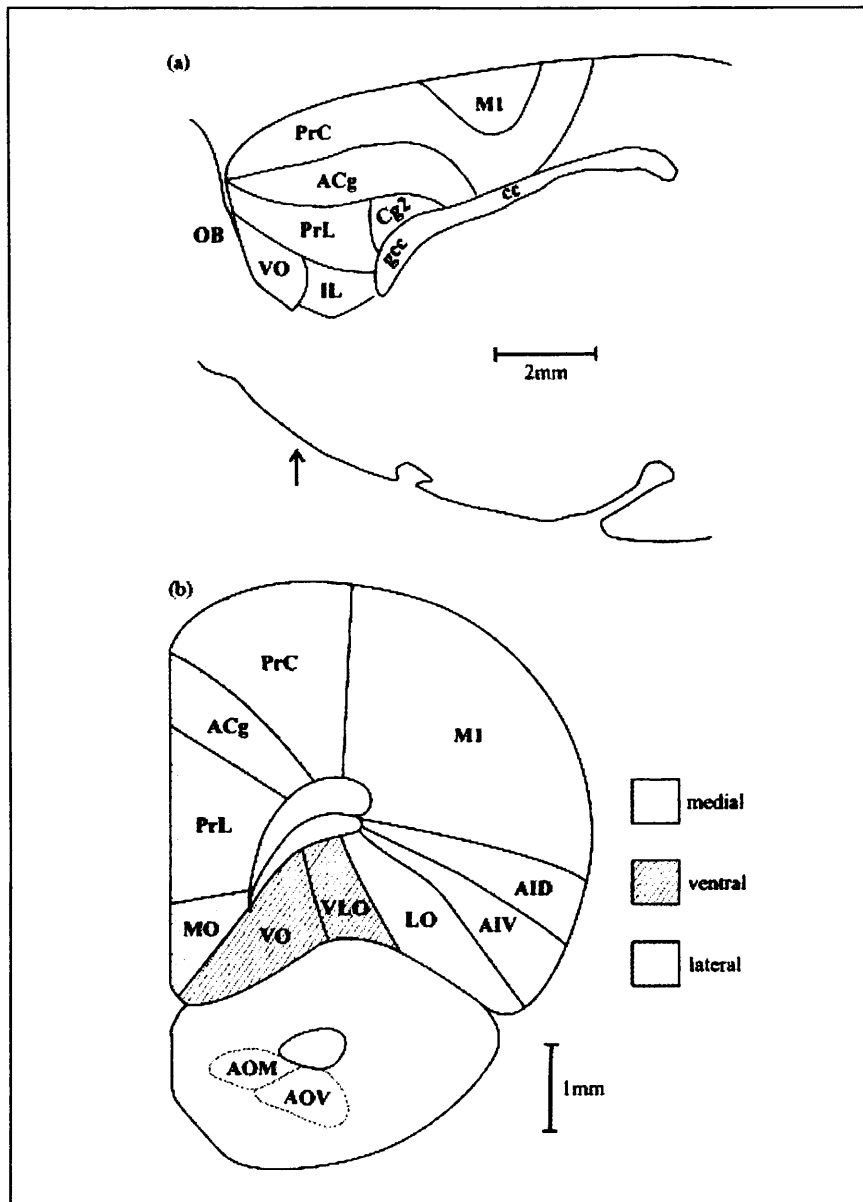


Figura 1. Esquema de la CPF de la rata. (a) Vista lateral; (b) Sección coronal unilateral. En el esquema se muestran las tres principales subdivisiones de la CPF (medial, ventral y lateral). Abreviaturas: ACg: corteza cingulada anterior; AID: corteza insular agranular dorsal; AIV: corteza insular agranular ventral; AOM: núcleo olfatorio anterior medial; AOV: núcleo olfatorio anterior ventral; cc: cuerpo calloso; Cg2: corteza cingulada; gcc: rodilla del cuerpo calloso; IL: corteza infralímbica; LO: corteza orbital lateral; M1: área motora primaria; MO: corteza orbital medial; OB: bulbo olfatorio; PrL: corteza prelímbica; PrC: corteza precentral; VLO: corteza orbital ventrolateral; VO: corteza orbital ventral (Tomado de Dalley et al., 2004).

En la corteza cerebral existen, en general, dos tipos de neuronas denominadas espinosas y no espinosas. Las neuronas espinosas pueden ser piramidales y no piramidales (De Felipe y Fariñas 1992).

Las neuronas no espinosas son interneuronas con distintas morfologías y patrones de arborización dendrítica. Constituyen del 15 al 30% de las neuronas de la corteza cerebral y están presentes en todas las áreas y capas corticales. La mayoría de estas interneuronas liberan el neurotransmisor GABA (Somogyi *et al.*, 1998).

Las neuronas piramidales son las células nerviosas más abundantes en todas las áreas corticales (70-85% del total) y están presentes en todas las capas, excepto en la I. Son las únicas neuronas de proyección de la corteza y son exclusivas de ella. En cualquier caso, constituyen un grupo heterogéneo, con características morfológicas diferentes (tamaño del soma, arborización dendrítica, colaterales axónicas, etc.), e incluso con distintas aferencias, lo que podría traducirse en diferencias funcionales entre los distintos subtipos de neuronas piramidales (De Felipe y Fariñas 1992; Somogyi *et al.*, 1998). La neurona piramidal típica presenta un soma triangular. De su polo superior nace una dendrita que se dirige hacia la superficie dando lugar a ramas oblicuas hasta alcanzar la capa I, donde se ramifica profusamente. En la base del soma se origina un sistema de largas dendritas dirigidas transversalmente o hacia capas más profundas. La superficie de las dendritas está cubierta de numerosas espinas. En la base de la célula se origina el axón, que se dirige hacia la profundidad abandonando la corteza, después de emitir varias colaterales que constituyen circuitos intracorticales de retroalimentación. Estas neuronas liberan el neurotransmisor glutamato.

Las neuronas espinosas no piramidales son interneuronas confinadas generalmente en las capas medias de la corteza. Existen varios tipos morfológicos, según la especie, el área cortical y la capa en que se encuentran.

Las neuronas piramidales y las interneuronas se encuentran interconectadas (De Felipe y Fariñas 1992; Somogyi *et al.*, 1998) y reciben aferencias desde otras áreas cerebrales, que liberan diferentes neurotransmisores.

3.2. Estructura neuroquímica de la corteza prefrontal.

3.2.1. Neurotransmisores en la corteza prefrontal.

La CPF es un área cerebral profusamente innervada. Ello hace que también sean múltiples los neurotransmisores presentes en ella y que modulan su actividad. Entre estos neurotransmisores se encuentran la dopamina (Lindvall *et al.*, 1978;Kalsbeek 1989;Parnavelas 1990), acetilcolina (Mora y Ferrer 1986;Descarries *et al.*, 1991;Descarries *et al.*, 1997), glutamato (Somogyi *et al.*, 1998;Del Arco *et al.*, 2003), GABA, serotonina, noradrenalina o péptidos opioides (Fonnum 1984;Mora y Ferrer 1986;Parnavelas 1990;Somogyi *et al.*, 1998). Algunos de estos neurotransmisores se describen a continuación por haber sido objeto de estudio en el presente trabajo de investigación. Para información más detallada sobre estos neurotransmisores pueden consultarse Cooper *et al.*, (1996) o Siegel *et al.*, (1999).

3.2.1.1. Dopamina.

La dopamina procede de las aferencias que llegan a través de la vía mesocortical, formada por neuronas dopaminérgicas cuyo soma se encuentra en el área tegmental ventral (A10) y que dirigen sus axones hacia la CPF a través del haz prosencefálico medial (Hokfelt *et al.*, 1974;Thierry *et al.*, 1976), aunque también proyecta a otras áreas como estriado ventral y la parte ventro-medial de la cabeza del caudado-putamen (Björklund y Dunnett 2007)(Figura 2). Una pequeña proporción de la dopamina de la CPF procede de la sustancia negra medial y dorsal (Arnsten 1998;Björklund y Dunnett 2007;Martín *et al.*, 2008). Los contactos sinápticos se producen sobre todo a través de las varicosidades presentes en los axones dopaminérgicos y llegan tanto a dendritas como a espinas dendríticas en capas profundas de la corteza (Parnavelas 1990;Tzschentke 2001). Si bien inicialmente se consideró a la dopamina como un neurotransmisor inhibitorio, hoy día se enfatiza más su papel como neuromodulador (Thierry *et al.*, 1990;Tzschentke 2001;Seamans y Yang 2004).

Algunos autores han diferenciado entre la liberación tónica de dopamina, que da lugar a una acción extrasináptica de este neurotransmisor, y una acción fásica, que se daría sólo a nivel de la hendidura sináptica y que mediaría funciones diferentes a las de la

dopamina tónica (Williams y Castner 2006; Grace *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2007). Se ha propuesto, de hecho, que las funciones en las que participa la dopamina podrían ser diferentes en función de la concentración de ésta, de la localización mayoritaria de los receptores (sináptica o extrasináptica), así como de su afinidad por la dopamina (Seamans y Yang 2004). Así, en la CPF, la dopamina presenta una especial facilidad para alcanzar el espacio extrasináptico, pudiendo alcanzar sinapsis relativamente lejanas, debido a que los transportadores de dopamina presentes en las fibras dopaminérgicas que alcanzan esta área (especialmente la división prelímbica) se expresan en baja densidad y no en las varicosidades, sino en zonas más distales, al contrario de lo que ocurre en otras áreas donde la dopamina no difunde tanto, como el estriado o la corteza cingulada (Sesack *et al.*, 1998). La Figura 3 muestra un esquema de una sinapsis dopaminérgica y del metabolismo de la dopamina.

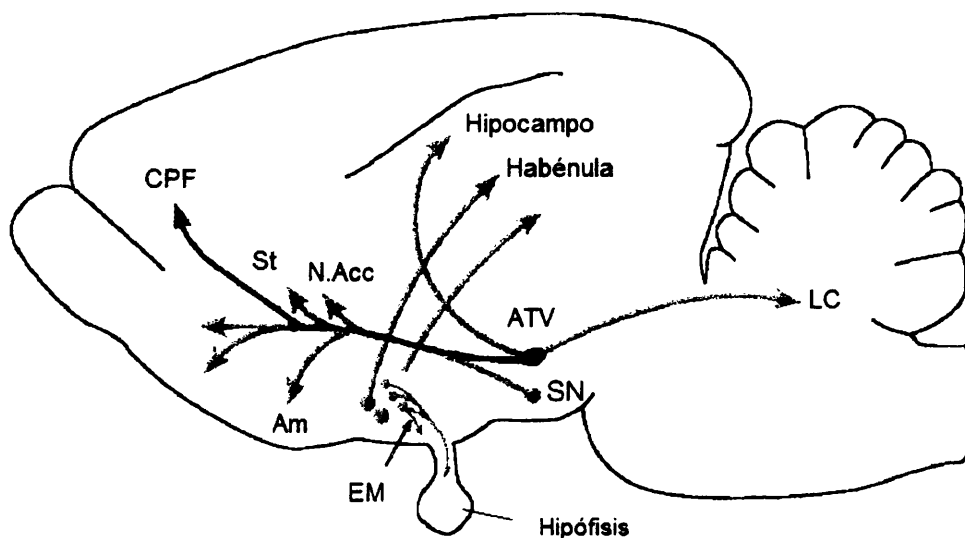


Figura 2. Esquema de un corte sagital de un cerebro de rata que muestra las principales vías dopaminérgicas. Marcada en verde se muestra la vía mesocortical, que se inicia en el área tegmental ventral (ATV) y concluye en la corteza prefrontal (CPF). También de ATV parte la vía mesolímbica, que envía proyecciones a diferentes regiones del sistema límbico entre las que se encuentran el núcleo accumbens (N.Acc) o la amígdala (Am). Entre las proyecciones del ATV también se encuentran el hipocampo o el *locus coeruleus*. Otro gran haz de fibras colinérgicas parte de la sustancia negra (SN) y concluye en el estriado (St). También se encuentran neuronas dopaminérgicas en la eminencia media, que proyectan sus axones hacia la hipófisis. (modificado de Fuster 2009).

La expresión y farmacología de los receptores de dopamina se ha estudiado detalladamente (Siegel *et al.*, 1999), ya que estos receptores son la diana principal de algunos tratamientos frente a la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson o la corea de Huntington. Los receptores de dopamina se dividen en dos familias, los receptores D1 y los D2. En la familia D1 se encuentran los D1 y los D5. Los D1 son más abundantes en la CPF (Goldman-Rakic 1996), presentan una sensibilidad similar a la de los D5 a agonistas, pero se desensibilizan con mayor facilidad que estos últimos (Seeman y Van Tol 1994). En la familia D2, se encuentran los D2 (variantes corta y larga), D3 y D4, siendo el D4 el más abundante de ellos en la CPF (Tzschentke 2001; Dalley y Everitt 2009). En el humano, existen un gran número de variantes, tanto de los receptores D3, como de los D4 (Seeman y Van Tol 1994). Los receptores D4 podrían ser relevantes en la esquizofrenia ya que se ha mostrado que son el principal sitio de acción de antipsicóticos atípicos como la clozapina (Sibley y Monsma 1992; Seeman y Van Tol 1994).

Todos los receptores de dopamina son similares estructuralmente, presentando 7 segmentos transmembrana, con el extremo N-terminal hacia el espacio extracelular y el C-terminal hacia la región intracelular y un sitio de fosforilación dependiente de AMP cíclico en el tercer bucle citosólico (Cooper *et al.*, 1996). Los receptores D1 son postsinápticos, se encuentran en neuronas piramidales e interneuronas GABAérgicas y actúan a través de proteínas G, activando a la enzima adenilato ciclasa. Los receptores D2 son pre- y postsinápticos e inhiben a la adenilato ciclasa, además de producir otros efectos moleculares, como la activación de canales de K^+ o la inhibición de canales de Ca^{2+} , que conducen a la inhibición de la síntesis y liberación de dopamina en la terminación presináptica (Sibley y Monsma 1992; Cooper *et al.*, 1996; Seamans y Yang 2004). Se ha propuesto que los autorreceptores D2 presentan una mayor afinidad por agonistas que los receptores D2 postsinápticos (Sibley y Monsma Jr, 1992). En ocasiones se han descrito efectos sinérgicos entre los receptores D1 y D2 (Sibley y Monsma 1992; Seeman y Van Tol 1994)

A nivel funcional, la dopamina en la CPF se ha relacionado con procesos como la respuesta a estrés (Thierry *et al.*, 1976), la memoria de trabajo (Goldman-Rakic 1995; Floresco y Magyar 2006), la atención (Robbins 1997; Chudasama y Robbins 2004), la flexibilidad cognitiva (Ragozzino 2002; Robbins y Roberts 2007), el

procesamiento de la recompensa y la asociación acción-respuesta en relación con ella (Spanagel y Weiss 1999;Tzschentke y Schmidt 2000;Dalley y Everitt 2009), la modulación de la LTP de las proyecciones desde el hipocampo a la CPF (Goto *et al.*, 2007), o la actividad motora (Iversen 1971;Del Arco *et al.*, 2007a).

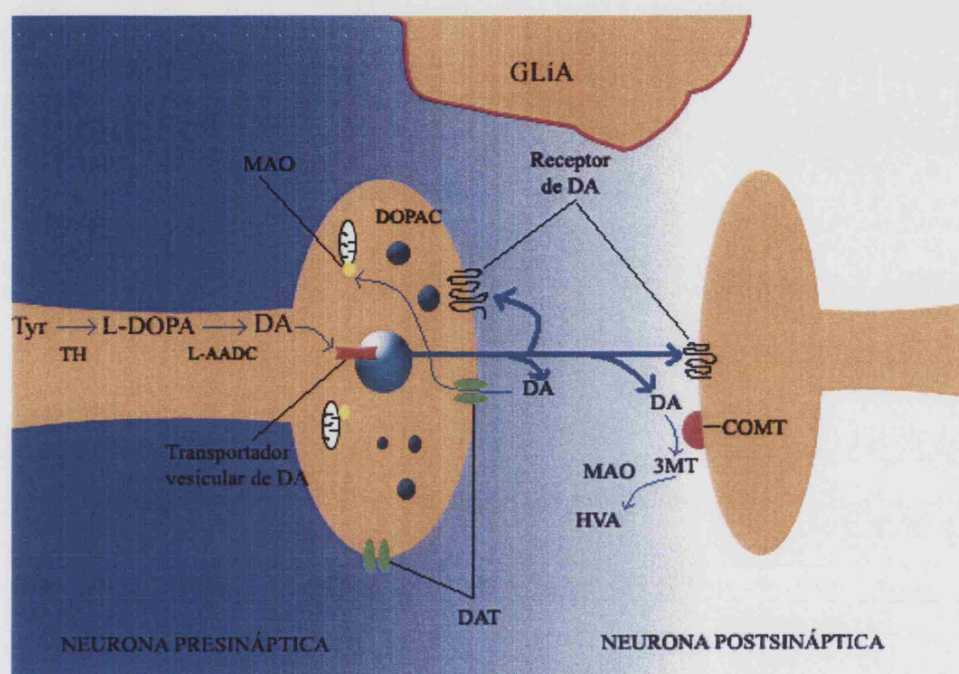


Figura 3. Esquema de una sinapsis dopaminérgica. La dopamina (DA) se sintetiza a partir de tirosina (Tyr), cuyo principal origen se encuentra en la dieta, y que es transformada en L-DOPA por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), que es la enzima reguladora de la ruta de síntesis de la dopamina. La L-DOPA es descarboxilada por la L-AADC dando lugar a la dopamina. Ésta es almacenada en vesículas gracias a un transportador vesicular, y se libera mediante exocitosis dependiente de Ca^{2+} . En la postsinapsis puede actuar sobre sus receptores D1 o D2. En la presinapsis la dopamina puede unirse a receptores D2 (autorreceptores), que regulan la síntesis y liberación del neurotransmisor. En el espacio sináptico, la dopamina puede inactivarse mediante la enzima catecol-o-metiltransferasa (COMT), que transforma la dopamina en el metabolito 3-metiltiramina (3MT) y que por acción de la monoaminoxidasa (MAO) se transforma en ácido homovanílico (HVA). La dopamina puede ser recaptada por transportadores de dopamina (DAT) presentes en la terminal presináptica, mediante transporte activo. Además, la dopamina puede difundir a través del espacio extracelular y actuar sobre receptores extrasinápticos (transmisión por volumen)(Zoli *et al.*, 1999). En el interior de la terminal presináptica, la dopamina es degradada por la MAO, dando lugar a ácido dihidroxifenilacético (DOPAC)(modificado de Kuhar *et al.*, 1999)

3.2.1.2.Acetilcolina.

La acetilcolina procede en su mayor parte de las aferencias que llegan desde el prosencéfalo basal, especialmente desde el núcleo basal magnocelular (grupo Ch4), que forma parte de la sustancia innominada (Rye *et al.*, 1984;Kurosawa *et al.*, 1989a;Parnavelas 1990;Jacobson *et al.*, 2008)(Figura 4). Los contactos sinápticos se producen sobre todo a través de las varicosidades presentes en los axones colinérgicos y llegan tanto a dendritas como a espinas dendríticas (Descarries *et al.*, 1991;Descarries *et al.*, 1997). Estos axones inervan todas las capas de la corteza cerebral y aunque se creía que su inervación era difusa hoy se sabe que pequeños grupos de células colinérgicas proyectan sobre zonas muy concretas de la corteza (Parnavelas 1990). Además, una pequeña parte de la acetilcolina (en torno al 5% del total) procede de interneuronas colinérgicas situadas sobre todo en las capas corticales II y III (Fuster 1997). La acetilcolina ejerce un papel modulador sobre la actividad de la CPF (Lucas-Meunier *et al.*, 2003). Al igual que en el caso de la dopamina, se ha sugerido que la liberación tónica de acetilcolina frente a su liberación fásica podrían jugar papeles diferentes, de modo que la actividad tónica jugaría un papel más importante en la activación general del animal (*arousal*) y mantenimiento de ésta y la actividad fásica jugaría un papel en procesos más concretos relacionados, sobre todo, con la atención selectiva (Parikh y Sarter 2008;Sarter *et al.*, 2009). También, como en el caso de la dopamina, se ha sugerido que la acetilcolina puede alcanzar sinapsis relativamente lejanas gracias a que puede salir fácilmente de la región sináptica (Descarries *et al.*, 1997;Zoli *et al.*, 1999). La Figura 5 muestra un esquema de una sinapsis colinérgica y el metabolismo de la acetilcolina.

Los receptores colinérgicos se dividen en dos grandes grupos: nicotínicos y muscarínicos. Los receptores nicotínicos son ionotrópicos y son homo- o heteropentámeros de subunidades α (desde α_2 a α_{10}) y β (desde β_2 hasta β_4) en el sistema nervioso central (Gotti *et al.*, 2007). Las combinaciones más abundantes en la corteza cerebral de roedores son el heteropentámero formado por subunidades α_4/β_2 y el homopentámero α_7 (Gotti *et al.*, 2007). Se localizan tanto pre- como postsinápticamente y presentan permeabilidad para cationes K^+ , Na^+ o Ca^{2+} , dependiendo de la combinación de subunidades de la que estén compuestos (Taylor y Brown 1999). Estos

receptores pueden regular la liberación de acetilcolina, dopamina, glutamato, GABA y noradrenalina a nivel presináptico (Gotti *et al.*, 2007). Por otro lado, los receptores muscarínicos son metabotrópicos y se conocen variantes que abarcan desde la M_1 a la M_7 . Son receptores acoplados a proteínas G y pueden actuar directamente sobre canales iónicos o bien sobre cadenas de segundos mensajeros (Cooper *et al.*, 1996). Los M_2 y M_4 son presinápticos, mientras que M_1 , M_3 y M_5 son postsinápticos (Taylor y Brown 1999). En la corteza cerebral se expresan desde el M_1 al M_5 , siendo el M_1 y el M_3 los que lo hacen en mayor proporción (Wei *et al.*, 1994).

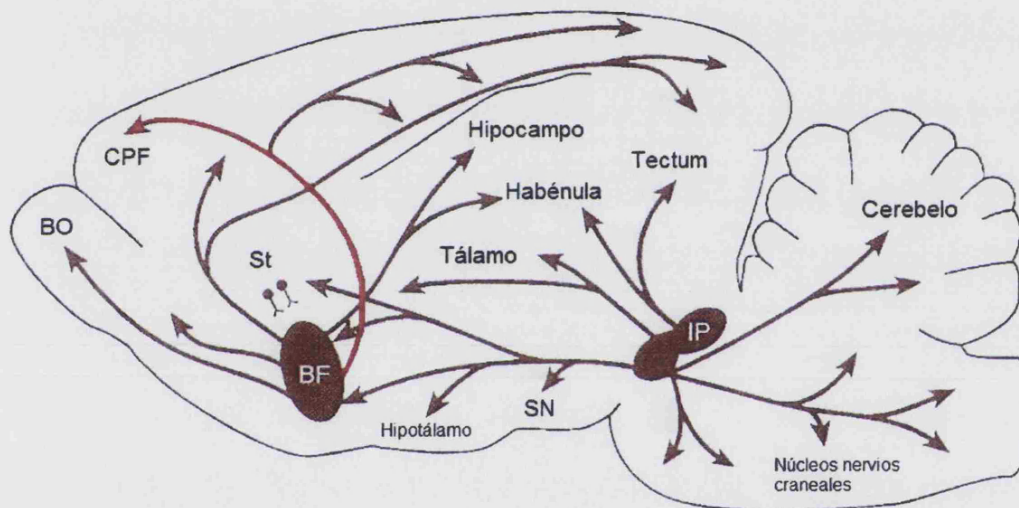


Figura 4. Esquema de un corte sagital de un cerebro de rata que muestra las principales vías colinérgicas. En rojo se muestra la vía que parte del núcleo basal magnocelular, que se encuentra inmerso en el telencéfalo basal (BF) y que proyecta a la corteza prefrontal (CPF). Desde BF también parten axones hacia diferentes regiones de la corteza cerebral, hacia el hipocampo (vía septo-hipocampal) o hacia el bulbo olfatorio (BO): El otro gran origen de neuronas colinérgicas se encuentra en el núcleo interpeduncular (IP), que proyecta a diversas regiones cerebrales entre las que se encuentran el tálamo, la habénula, el tectum, el cerebelo, el hipotálamo o la sustancia negra (SN). También existen interneuronas colinérgicas en el estriado (St), el núcleo accumbens o la CPF (modificado de Fuster 2009).

Entre las funciones con las que se ha relacionado a la acetilcolina en la CPF se encuentran la memoria de trabajo (Hironaka *et al.*, 2001), la atención (Baxter y Chiba 1999; Dalley *et al.*, 2004; Kozak *et al.*, 2005), el aprendizaje inverso (Robbins y Roberts 2007), o la exploración y actividad motora (Giovannini *et al.*, 1998; Pepeu y Giovannini 2004).

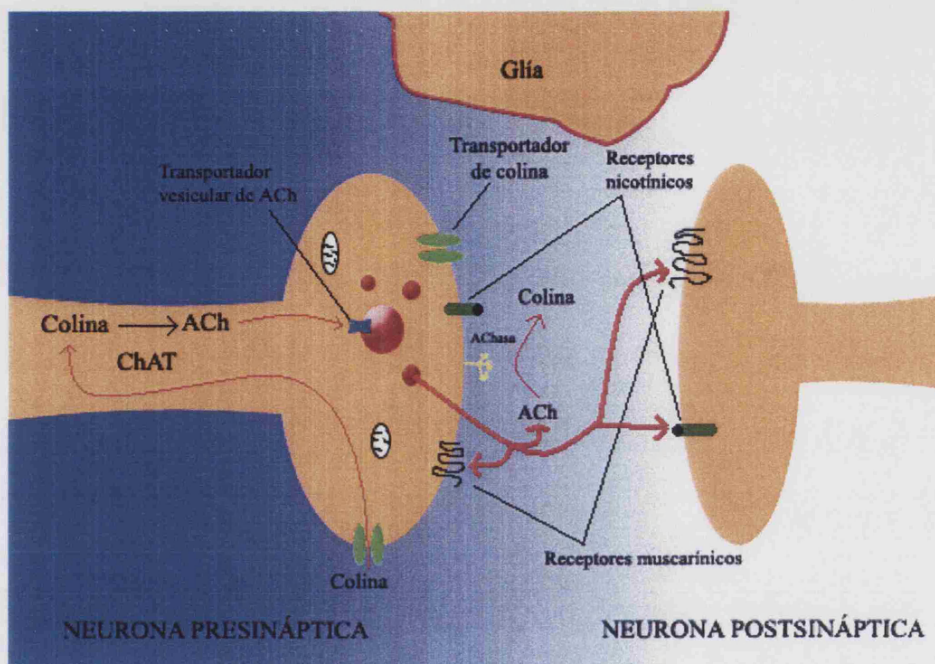


Figura 5. Esquema de una sinapsis colinérgica. La síntesis de acetilcolina (ACh) se produce tras la reacción química catalizada por la enzima colina acetil transferasa (ChAT), que transfiere un grupo acetilo a la colina, la cual procede del metabolismo celular, de la membrana celular o, en su mayor parte, del espacio extracelular. La acetilcolina sintetizada se almacena en vesículas gracias a un transporte activo al interior de éstas, y se libera por exocitosis dependiente de Ca^{2+} . En el espacio extracelular la acetilcolina puede actuar sobre receptores nicotínicos o muscarínicos: los primeros son ionotrópicos; los segundos, metabotrópicos. Tanto los receptores ionotrópicos como los metabotrópicos pueden encontrarse también en la terminal presináptica (autorreceptores) regulando la síntesis y liberación de acetilcolina. La enzima acetilcolinesterasa (AChasa), que escinde la molécula de acetilcolina en una de colina y un grupo acetilo da lugar a la inactivación de la acetilcolina en el espacio extracelular. Además, la acetilcolina puede difundir a través del espacio extracelular y actuar sobre receptores extrasinápticos (transmisión por volumen) (Zoli *et al.*, 1999). La colina es recaptada por la terminal presináptica por medio de un transportador de colina, a través de un transporte activo introduce a la colina en la terminal, pudiendo servir de nuevo ésta para sintetizar acetilcolina (modificado de Taylor y Brown 1999)

3.2.1.3. Glutamato.

La CPF es un área profusamente innervada por vías glutamatérgicas, que proceden de diversas áreas cerebrales y alcanzan todas las capas corticales. Estas terminaciones tienen su origen principalmente en neuronas espinosas piramidales intrínsecas, en aferencias talamocorticales (principalmente el núcleo mediodorsal) y en aferencias desde otras áreas de corteza (Fonnum 1984; Peinado y Mora 1986; Mora y Cobo 1990; De Felipe y Fariñas 1992; Somogyi *et al.*, 1998). También son importantes por sus implicaciones funcionales las aferencias glutamatérgicas desde el hipocampo (Cotman *et al.*, 1987; Carr y Sesack 1996). Además, las neuronas piramidales controlan localmente la actividad de la CPF a través de axones recurrentes (Figura 6). Estas neuronas piramidales se distribuyen en las capas corticales II a VI (Parnavelas 1990). Las neuronas piramidales presentes en la CPF envían a su vez proyecciones glutamatérgicas recíprocas a muchas de las áreas cerebrales de las que recibe aferencias (Vertes 2004)(ver Figura 6).

Probablemente son las neuronas grandes de la capa V las responsables de la mayor eferencia glutamatérgica cortical a estructuras subcorticales. Como en el resto del sistema nervioso central, el glutamato ejerce una acción sináptica que es fundamentalmente excitadora (Fonnum 1984; Somogyi *et al.*, 1998), aunque puede ejercer un papel neuromodulador a través de su unión a receptores metabotrópicos. Algunos autores han propuesto, sin embargo, funciones diferentes del glutamato en función de si éste se encuentra en el espacio sináptico o en el extrasináptico (Zoli *et al.*, 1999; ver Discusión de Métodos). Por ejemplo, se ha propuesto que el glutamato, al unirse a receptores NMDA presentes en la región sináptica favorecería la supervivencia celular, mientras que cuando se une a los que se encuentran en la región extrasináptica favorecería la muerte celular (Cull-Candy *et al.*, 2001; Hardingham y Bading 2003).

Existen receptores ionotrópicos y metabotrópicos para glutamato. Los ionotrópicos, caracterizados por su afinidad por distintas moléculas, son:

-Receptores AMPA: son canales iónicos para iones monovalentes (Na^+ y K^+), pero también son permeables a Ca^{2+} . Están formados por una combinación múltiple de 4 subunidades (GluR1-GluR4), que dará lugar a diferentes características funcionales.

(Cooper *et al.*, 1996; Rao y Finkbeiner 2007). Se pueden situar tanto en la zona sináptica como en la extrasináptica y su localización puede condicionar, a su vez, la de los receptores NMDA.

-Receptores NMDA: son canales catiónicos permeables a Na^+ y a Ca^{2+} y su activación es dependiente de potencial, razón por la que a menudo se encuentran situados cerca de los receptores AMPA (Cooper *et al.*, 1996). En la postsinapsis, estos receptores tienden a encontrarse embebidos en una estructura proteica denominada densidad postsináptica (Rao y Finkbeiner 2007). Su estructura está formada por varias subunidades (NR1 a NR4) que presentan a su vez, variantes generadas por *splicing*. Todos presentan varias subunidades NR1 y al menos una NR2 y las distintas combinaciones de subunidades dan lugar a diferencias funcionales (Cull-Candy *et al.*, 2001). Tanto los receptores AMPA como los NMDA participan en la generación de la LTP y en otras respuestas a la estimulación continuada, como la formación de nuevas espinas dendríticas, a través de señales de calcio que promueven la activación de diversos factores de transcripción (Rao y Finkbeiner 2007). Ambos tipos de receptores se encuentran altamente expresados en el hipocampo y la corteza cerebral, que son regiones cerebrales muy implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje (Faroqui y Horrocks 1991; Cooper *et al.*, 1996). Se ha sugerido la presencia de receptores AMPA y NMDA tanto en la presinapsis como en la postsinapsis de neuronas piramidales glutamatérgicas y de interneuronas GABAérgicas (Somogyi *et al.*, 1998).

-Receptores kainato: presentan permeabilidad para Na^+ y K^+ . Se han identificado hasta 5 subtipos de receptores de kainato (GluK1-GluK5) (Jane *et al.*, 2009). Su función no es clara todavía, sobre todo debido a los escasos agonistas selectivos que existen para estos receptores (Rao y Finkbeiner 2007; Jane *et al.*, 2009). Su localización es complementaria a la de los receptores AMPA y NMDA, si bien, están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (Sprengel y Seeburg 1993).

En cuanto a los receptores metabotrópicos, se han descrito hasta 8 tipos diferentes (mGluR1-8), que se han clasificado con diferente afinidad por diversos agonistas y su acción sobre diferentes vías de segundos mensajeros (Schoepp y Conn 1993; Pin y Duvoisin 1995; Cooper *et al.*, 1996). Así, los mGluR1 y 5 responden mejor al quisqualato y su estimulación activa la vía del inositol fosfato y, por tanto, la liberación

de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico. Los mGluR2 y 3 responden mejor a trans-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato y su estimulación inhibe a la enzima adenilato ciclasa. Los mGluR4, 6 y 7 responden mejor al L-amino-4-fosfonobutirato y su activación también inhibe a la adenilato ciclasa. Estos receptores pueden situarse tanto pre- como postsinápticamente. Su acción presináptica puede ser tanto inhibidora como activadora de la liberación de glutamato (Schoepp y Conn 1993; Sánchez-Prieto *et al.*, 1996; Martín *et al.*, 2008).

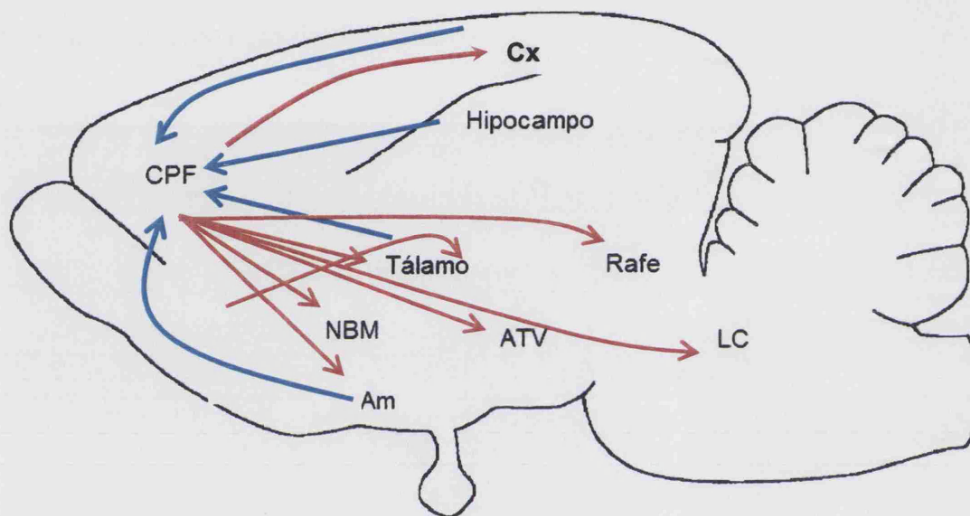


Figura 6. Esquema de un corte sagital de un cerebro de rata en el que se muestran las principales aferencias (azul) y eferencias (rojo) glutamatergicas de la corteza prefrontal (CPF). Obsérvese que la mayoría de las áreas que envían proyecciones glutamatergicas a la CPF, como hipocampo, amígdala (Am), tálamo y otras áreas de la corteza cerebral reciben a su vez proyecciones glutamatergicas de la propia CPF. La CPF controla además, mediante eferencias glutamatergicas, los principales núcleos aminérgicos, entre los que se encuentran, el área tegmental ventral (ATV), el rafe, el locus coeruleus (LC) o el núcleo basal magnocelular (NBM).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador. Se han propuesto diversas funciones para el glutamato en la CPF, entre las que se encuentran la modulación de la memoria de trabajo (Goldman-Rakic 1995; Verma y Moghaddam 1996; Romanides *et al.*, 1999), o la modulación de la LTP que se genera en las aferencias desde el hipocampo ventral a la CPF (Gurden *et al.*, 2000). Goldman-Rakic (1995; 1996) propuso el concepto de tríada sináptica que supone una interacción entre dopamina y glutamato sobre las espinas dendríticas de las neuronas piramidales que determinaría la adecuada regulación de las funciones que dependen de la CPF, como la memoria de trabajo. Esta unidad funcional se encontraría, según Goldman-Rakic, regulada de forma anómala en los pacientes esquizofrénicos.

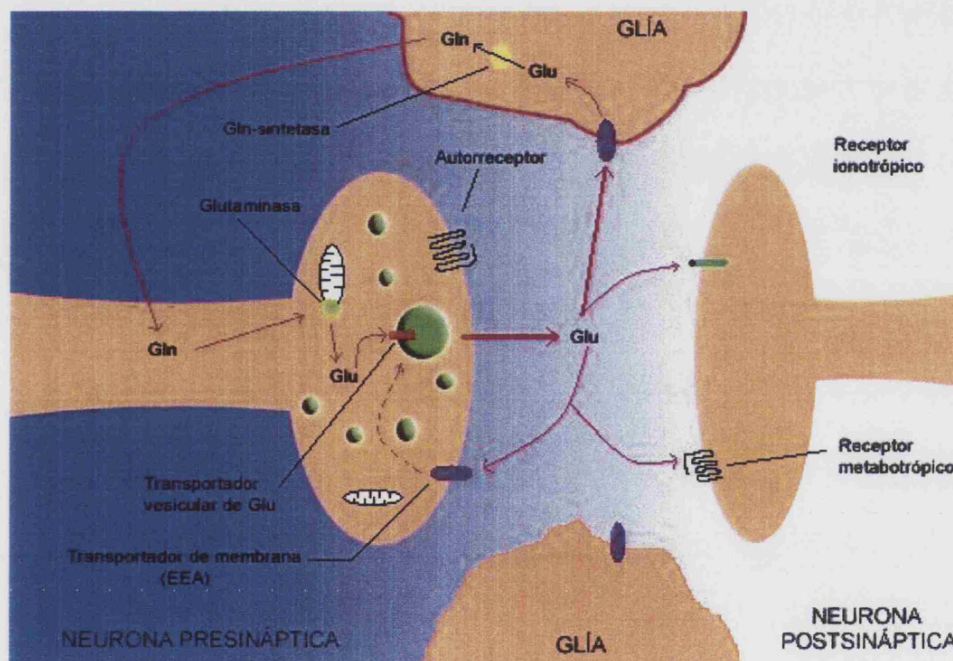


Figura 7. Esquema de una sinapsis glutamatérgica. El glutamato (Glu) es sintetizado a partir de glutamina (Gln) que procede del metabolismo del glutamato en las células gliales. La síntesis de glutamato tiene lugar a través de una carboxilación de la glutamina a través de la enzima glutaminasa, situada en la pared mitocondrial. El glutamato sintetizado se almacena en vesículas sinápticas a las que se incorpora mediante un transporte activo favorecido por un transportador vesicular. El glutamato se libera al espacio sináptico a través de un proceso de exocitosis dependiente de Ca^{2+} . En el espacio sináptico, el glutamato puede unirse a receptores postsinápticos tanto ionotrópicos (AMPA, NMDA o kainato) como metabotrópicos. En la terminación presináptica se encuentran receptores metabotrópicos que pueden promover la inhibición de la síntesis o de la liberación de glutamato. A su vez, el glutamato puede ser recaptado por la neurona presináptica a través de transportadores de membrana para aminoácidos excitadores (EEA) para almacenarse de nuevo en vesículas sinápticas. Pero la mayor parte del glutamato de la sinapsis es incorporado a la glía a través de este mismo tipo de transportadores. En la glía, el glutamato puede ser liberado al espacio extracelular o transformarse en glutamina gracias a la acción de la enzima glutaminasa. La glutamina se libera al espacio extracelular desde la glía y se incorpora a las neuronas a través de transportadores de membrana.

3.3. Funciones de la corteza prefrontal.

El patrón de conexiones de la CPF determina las funciones en las que esta área cerebral participa. Son múltiples las funciones con las que se ha relacionado a la CPF. Entre las principales se encuentran la respuesta a estrés (Deutch y Roth 1990;Thierry *et al.*, 1990), la memoria de trabajo (Williams y Goldman-Rakic 1995;D'Esposito 2007) la flexibilidad cognitiva (Ragozzino 2002;Robbins y Roberts 2007), la atención selectiva (Birrell y Brown 2000;Kozak *et al.*, 2005), la organización temporal del comportamiento (Fuster 2000;Uylings *et al.*, 2003), la actividad motora (Tzschentke y Schmidt 2000), la interacción social (De Bruin 1990), la inhibición del comportamiento (Robbins 2007) o el procesamiento cognitivo de las recompensas (Mora y Myers 1977). A continuación se describen con mayor detalle las funciones de la CPF que se han evaluado en el presente trabajo de investigación.

3.3.1. Actividad motora.

Se ha atribuido a la CPF un papel en la regulación de la actividad motora debido a sus múltiples conexiones con los ganglios basales y la corteza motora (Fuster 2000). Además, la CPF también está implicada en la respuesta a estímulos novedosos (Dias y Honey 2002;Dalley *et al.*, 2004), como lo es la introducción de animales en un ambiente que no han tenido ocasión de explorar previamente.

Son múltiples los estudios que han relacionado a la actividad motora con diferentes sistemas de neurotransmisión en la CPF. Se ha observado que ratas con lesiones en la CPF muestran una actividad motora incrementada con respecto a ratas no lesionadas (Iversen 1971). Los sistemas dopaminérgico, colinérgico y glutamatérgico han sido relacionados con la regulación de la actividad motora por parte de la CPF. De hecho, la lesión selectiva de neuronas dopaminérgicas en la CPF da lugar a un incremento de la actividad motora (Tzschentke y Schmidt 2000; Arnsten y Li 2005). Otros estudios han mostrado que la estimulación de receptores dopaminérgicos en la CPF tiene un papel inhibitorio sobre la actividad motora (Tzschentke 2001), aunque la función específica de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 prefrontales sobre ésta aún ha de dilucidarse (Iversen 1971;Leng *et al.*, 2004;Sorg *et al.*, 2004;Del Arco *et al.*, 2007c). Además, la nicotina produce incrementos de dopamina en la CPF y da lugar a hiperlocomoción

(Green *et al.*, 2003). Por otro lado, la lesión de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal da lugar a hiperlocomoción (Mattsson *et al.*, 2002). Algunos trabajos han mostrado, por otro lado, una correlación positiva entre los niveles de acetilcolina en la CPF y la actividad motora (Day *et al.*, 1991; Mitsushima *et al.*, 1996; Giovannini *et al.*, 1998). En cuanto a la neurotransmisión glutamatérgica, el bloqueo de receptores NMDA de glutamato en la CPF también da lugar a hiperlocomoción (Del Arco *et al.*, 2008).

3.3.2. Memoria de trabajo.

La memoria de trabajo se define habitualmente como la capacidad para retener información que ha de mantenerse activa y que es relevante sólo durante un período de tiempo corto, generalmente en la escala de segundos o de unos pocos minutos (Goldman-Rakic 1995). Desde hace algunos años, sin embargo, se ha propuesto la existencia de un componente a largo plazo y otro a corto plazo, gracias a diversos trabajos mediante un protocolo modificado del laberinto radial (Floresco y Magyar 2006). El concepto de memoria de trabajo empleada en el caso de humanos difiere del empleado en el caso de roedores, ya que si bien incluye entre sus componentes, uno ejecutivo central y otro visuoespacial, presentaría además un bucle fonológico que evidentemente no poseen los roedores (Baddeley 1992), aunque aún existen dudas sobre si este componente constituye un elemento independiente dentro del concepto de memoria de trabajo (D'Esposito 2007).

La CPF está implicada en el mantenimiento de la memoria de trabajo en roedores, monos y humanos (Jonides *et al.*, 1993; Fuster 2000; Castner *et al.*, 2004; Robbins y Roberts 2007). Diferentes estudios de lesiones en la CPF han mostrado déficits en la realización de pruebas que evalúan la memoria de trabajo (Pacteau *et al.*, 1989; Dias y Aggleton 2000; Aultman y Moghaddam 2001; Le Marec *et al.*, 2002).

Gran número de trabajos han relacionado a la dopamina liberada en la CPF con el correcto funcionamiento de la memoria de trabajo. El primer trabajo en hacerlo fue el de Brozoski *et al.* (1979) en el que lesiones selectivas de las neuronas dopaminérgicas en la CPF daban lugar a déficits en una prueba de memoria de trabajo realizada por monos *Rhesus*. Además, estos efectos se revertían con la inyección de L-DOPA o de

apomorfina. Algunos años después, Watanabe *et al.* (1997) observaron que cuando un animal realiza una tarea de memoria de trabajo se incrementan los niveles de dopamina en la CPF. Mientras tanto, los diferentes trabajos llevados a cabo por el grupo de Patricia Goldman-Rakic y otros autores dieron lugar a la idea de que los niveles de activación de los receptores D1 de dopamina en la CPF guardan una relación en forma de U invertida con los de la eficacia en la realización de una prueba de memoria de trabajo (Sawaguchi y Goldman-Rakic 1991; Arnsten y Goldman-Rakic 1998; Mizoguchi *et al.*, 2004; Williams y Castner 2006). Así, tanto la baja estimulación (producida por la lesión de neuronas dopaminérgicas o el empleo de antagonistas), como la alta estimulación de los receptores D1 (producida por estrés o altas dosis de agonistas), producen déficits en la realización de pruebas de memoria de trabajo (Williams y Goldman-Rakic 1995; Murphy *et al.*, 1996; Zahrt *et al.*, 1997; Arnsten y Goldman-Rakic 1998; Aultman y Moghaddam 2001; Mizoguchi *et al.*, 2004; Del Arco *et al.*, 2007b). Algunos de estos resultados se han encontrado empleando un protocolo modificado del laberinto radial para evaluar específicamente la memoria de trabajo (Seamans *et al.*, 1998; Phillips *et al.*, 2004; Floresco y Magyar 2006).

A pesar de la gran cantidad de trabajos que relacionan la dopamina en la CPF con la memoria de trabajo, algunos autores han sugerido que su papel sería más limitado o incluso que no tendría papel alguno sobre la memoria de trabajo (Romanides *et al.*, 1999; Rossetti y Carboni 2005). Otros autores han mostrado la importancia de otros sistemas de neurotransmisión en la CPF en el mantenimiento de la memoria de trabajo, como el colinérgico (Broersen *et al.*, 1995; Hironaka *et al.*, 2001), el glutamatérgico (Romanides *et al.*, 1999; Aultman y Moghaddam 2001) o el noradrenérgico (Rossetti y Carboni 2005). Además, hoy día se admite que la memoria de trabajo no está localizada en un área cerebral determinada, sino que sería mantenida por la interacción funcional de diversas áreas, entre las que se encontraría la CPF (D'Esposito 2007).

Las pruebas que se emplean para evaluar la memoria de trabajo en roedores, monos o humanos presentan aproximadamente las mismas características, a pesar de los matices que diferencian el concepto de esta función entre las distintas especies. Estas pruebas suelen compartir el hecho de que se incorpora un intervalo de tiempo (*delay*) durante el cual el individuo debe retener una información que le ha sido proporcionada durante una fase de entrenamiento o adquisición y que ahora no se encuentra disponible en el

ambiente, pero será útil para realizar la tarea durante una segunda fase denominada fase de test o de recuerdo. Entre las pruebas más empleadas para evaluar la memoria de trabajo se encuentran las de alternancia espontánea o las de no-correspondencia a una muestra con retraso (*delayed-non-match to position*). Ejemplos de estas pruebas son los laberintos en T y en Y, o algunos protocolos que se llevan a cabo en cajas operantes con dos palancas (Aultman y Moghaddam 2001; Lalonde 2002; Castner *et al.*, 2004; Dudchenko 2004; Del Arco *et al.*, 2007b; Carrillo-Mora *et al.*, 2009). También se emplean pruebas de memoria de trabajo espacial en las que se suelen aplicar variantes del protocolo del laberinto radial (Diamond *et al.*, 1996; Shukitt-Hale *et al.*, 2004; Dudchenko 2004; Floresco y Magyar 2006).

3.3.3. La respuesta a estrés.

Por ser ésta una función que se evalúa específicamente en el presente estudio y dado que su regulación no sólo implica a la CPF, sino a otras áreas cerebrales, y a que esta función consta de la activación de respuestas tanto nerviosas como hormonales, se detallan a continuación en un apartado independiente.

4.LA RESPUESTA A ESTRÉS.

4.1. El eje hipotálamo hipófisis adrenal y su regulación.

El estrés se puede definir como una amenaza potencial o real a la homeostasis del organismo (Selye 1976;McEwen 2000). La respuesta a estrés consiste en la activación de un conjunto de mecanismos neurales y hormonales que, de forma conjunta, contribuyen al restablecimiento de la homeostasis que ha sido o potencialmente será alterada por el agente estresante. El aspecto tradicionalmente más estudiado en relación con la respuesta a estrés es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). El estímulo estresante estimula la actividad del eje HHA, cuya activación conduce a la liberación del factor de liberación de corticotropina (CRF) desde el hipotálamo, que alcanza la eminencia media de la hipófisis, donde promueve la liberación de corticotropina (ACTH) a la sangre y ésta, finalmente, conduce a la liberación de glucocorticoides desde la corteza adrenal (corticosterona en la rata, y cortisol en el humano y en la mayoría de los mamíferos) (Ulrich-Lai y Herman 2009).

La CORT ejerce sus diversas acciones en el organismo a través de dos tipos de receptores: los receptores de mineralocorticoides (MRs) o receptores de tipo I, que son de alta afinidad, y los receptores de glucocorticoides (GRs) o de tipo II, que muestran una afinidad 10 veces inferior a la de los MRs (de Kloet *et al.*, 2005). Estos receptores se encuentran en el citoplasma y, una vez unidos a su agonista, se dirigen al núcleo celular, donde activan o inhiben la transcripción de diversos genes (de Kloet 2000). Estos efectos genómicos de la CORT son los más ampliamente descritos, si bien diferentes estudios han mostrado efectos rápidos de la CORT no mediados por efectos genómicos, tanto a nivel conductual, como neuroquímico y electrofisiológico (Sandi *et al.*, 1996;Venero y Borrell 1999;Dallman 2005;Herbert *et al.*, 2006;de Kloet *et al.*, 2008;Jöels *et al.*, 2008). Estos últimos efectos serían mediados a través de receptores de membrana que aún no han podido ser identificados, si bien se cree que podrían no ser muy diferentes de los receptores citosólicos (Jöels *et al.*, 2008).

La CORT liberada desde las glándulas adrenales ejerce acciones a nivel sistémico para hacer frente a la situación de estrés, promoviendo aquellos procesos que facilitan un aporte rápido de energía al organismo, ya sea activándolos (glucólisis, glucogenolisis,

proteolisis) o inhibiéndolos (gametogénesis, glucogenogénesis, inmunogénesis) (Sapolsky *et al.*, 2000). Pero además de estas acciones a nivel sistémico la CORT, gracias a su naturaleza lipofílica, atraviesa la barrera hematoencefálica y puede actuar sobre diversas áreas del sistema nervioso central que expresan MRs y/o GRs, mediando efectos a diversos niveles (celulares, neuroquímicos, conductuales).

El núcleo paraventricular del hipotálamo presenta una gran expresión tanto de MRs como de GRs, que controlan la activación del eje HHA mediante un mecanismo de retroalimentación negativa., de modo que altas concentraciones de CRF, ACTH o corticosterona (CORT) conducen a la inhibición del eje HHA actuando sobre receptores específicos (Herman *et al.*, 2005). Los MRs, debido a su alta afinidad, están casi completamente ocupados cuando los niveles de CORT son basales, mientras que los GRs controlarían la activación del eje HHA cuando los niveles de CORT se han incrementado en respuesta a un estímulo estresante, si bien el hecho de que animales adrenalectomizados muestren también este mecanismo de retroalimentación negativa sugiere que los MRs también podrían jugar cierto papel en este proceso (de Kloet *et al.*, 2005;Herman *et al.*, 2005).

Sin embargo, no es sólo el hipotálamo el que ejerce un control negativo sobre la secreción de CORT, sino que otras áreas extrahipotalámicas, como la CPF o el hipocampo pueden también inhibir dicha secreción (Magariños *et al.*, 1987;Diorio *et al.*, 1993). El control inhibitorio ejercido por la CPF y el hipocampo sobre la actividad del eje HHA así como la expresión de receptores de glucocorticoides en ellas son cuestiones relevantes para el estudio de la respuesta a estrés, especialmente en lo que respecta a la respuesta conductual al estrés, dado el papel que ambas áreas cerebrales juegan en diversos procesos cognitivos (Squire y Zola-Morgan 1988;Kim y Diamond 2002;Arnsten y Li 2005;Robbins 2005a). Este control inhibitorio sobre el eje HHA no se lleva a cabo, sin embargo, mediante proyecciones directas de CPF o hipocampo al núcleo paraventricular del hipotálamo, sino que probablemente lo ejercen de forma indirecta, a través de proyecciones a neuronas GABAérgicas del núcleo del lecho de la estría terminal (Herman *et al.*, 2005;Radley *et al.*, 2009).

El mecanismo de retroalimentación negativa se da en dos fases, una rápida en la que la CORT controlaría la liberación de CRH y ACTH en el hipotálamo mediante un

mecanismo de acción no genómico, y una retrasada, mediante acciones genómicas, en la que intervendrían las regiones límbicas (Herman *et al.*, 2005; Dallman 2005; Jöels *et al.*, 2008)

En la CPF la densidad de GRs es alta, pero no así la de MRs, mientras que el hipocampo presenta una alta densidad tanto de MRs, como de GRs (Reul y de Kloet 1985; Meaney y Aitken 1985; McEwen *et al.*, 1986), por lo que se ha propuesto que el hipocampo intervendría en el control del eje tanto en condiciones basales como de estrés, mientras que la CPF sólo lo haría en condiciones de estrés (Ulrich-Lai y Herman 2009). Además, ratas con un implante de CORT en la CPF muestran menores incrementos de ACTH y CORT en respuesta a estrés (Diorio *et al.*, 1993; Akana *et al.*, 2001). Por último, ratones que carecen de GRs de forma selectiva en la corteza cerebral y el hipocampo muestran mayores niveles basales de CORT, así como una respuesta prolongada de CORT a un estímulo estresante (Boyle *et al.*, 2005).

Dado que la CPF, el hipocampo o la amígdala juegan un papel importante en el procesamiento de los estímulos estresantes, es importante, a su vez, la regulación que ejercen estas áreas sobre la actividad del eje HHA (Herman *et al.*, 2005). Se ha propuesto, de forma general un papel inhibidor de la actividad del eje HHA para la CPF y el hipocampo y un papel activador para la amígdala. Así, lesiones del hipocampo o de la CPF dan lugar a una liberación más prolongada de CORT en respuesta a estrés (Sapolsky *et al.*, 1984; Magariños *et al.*, 1987; Diorio *et al.*, 1993; Brake *et al.*, 2000; Radley *et al.*, 2006; Radley *et al.*, 2009) y a una liberación reducida en el caso de lesiones en la amígdala (Goldstein *et al.*, 1996)(Figura 8).

La naturaleza del estímulo estresante es importante a la hora de delimitar qué áreas del cerebro se activan en respuesta a estrés. Los estímulos estresantes se han clasificado, en grandes términos, como físicos (entre los que se incluyen la pérdida de sangre, infecciones o dolor) y no físicos o “psicogénicos”, que están basados en experiencias pretéritas o en respuestas innatas programadas (restricción del movimiento, exposición a un depredador natural, o diversos tipos de condicionamiento), si bien no siempre es fácil separar ambos componentes del agente estresante (Lupien *et al.*, 2007; Ulrich-Lai y Herman 2009). De hecho, en base a esta distinta naturaleza del estímulo estresante, la CPF no siempre jugaría un papel inhibidor sobre el eje HHA. Algunos trabajos han

mostrado que la región prelímbica y otras más dorsales de la CPF inhibirían la actividad del eje HHA y responderían a estímulos estresantes de tipo psicogénico, mientras que la región infralímbica estimularía la actividad del eje HHA (y de las respuestas de tipo visceral, como la aceleración de los ritmos cardíaco y respiratorio) y respondería exclusivamente a estímulos estresantes de tipo físico (Diorio *et al.*, 1993; Sullivan 2004; Radley *et al.*, 2006). En general, los estímulos de tipo físico activan el sistema nervioso autónomo (activando el sistema nervioso simpático e inhibiendo el parasimpático) así como el eje HHA, y estas acciones tienen lugar a través del núcleo paraventricular hipotalámico o de las proyecciones del núcleo del tracto solitario sobre éste. Los estímulos de tipo psicogénico reclutan áreas del sistema límbico, como el hipocampo, la CPF o la amígdala, así como diversos núcleos mesencefálicos, como el núcleo del rafe dorsal, el *nucleus coeruleus*, o el área tegmental ventral (Herman *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 2005).

Además, existen otros condicionantes que hacen que existan diferencias en la magnitud de la respuesta a estrés, así como en la activación diferencial de áreas cerebrales. Entre estos condicionantes se encuentran la intensidad del estímulo estresante, su duración, su controlabilidad, el sexo del animal, el período del ciclo en el que se estudia la respuesta, las condiciones ambientales en las que se han criado o viven los animales, o variaciones individuales (diferencias a nivel genético) (Handa *et al.*, 1994; Piazza *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 2006; Lupien *et al.*, 2007; Armario *et al.*, 2008).

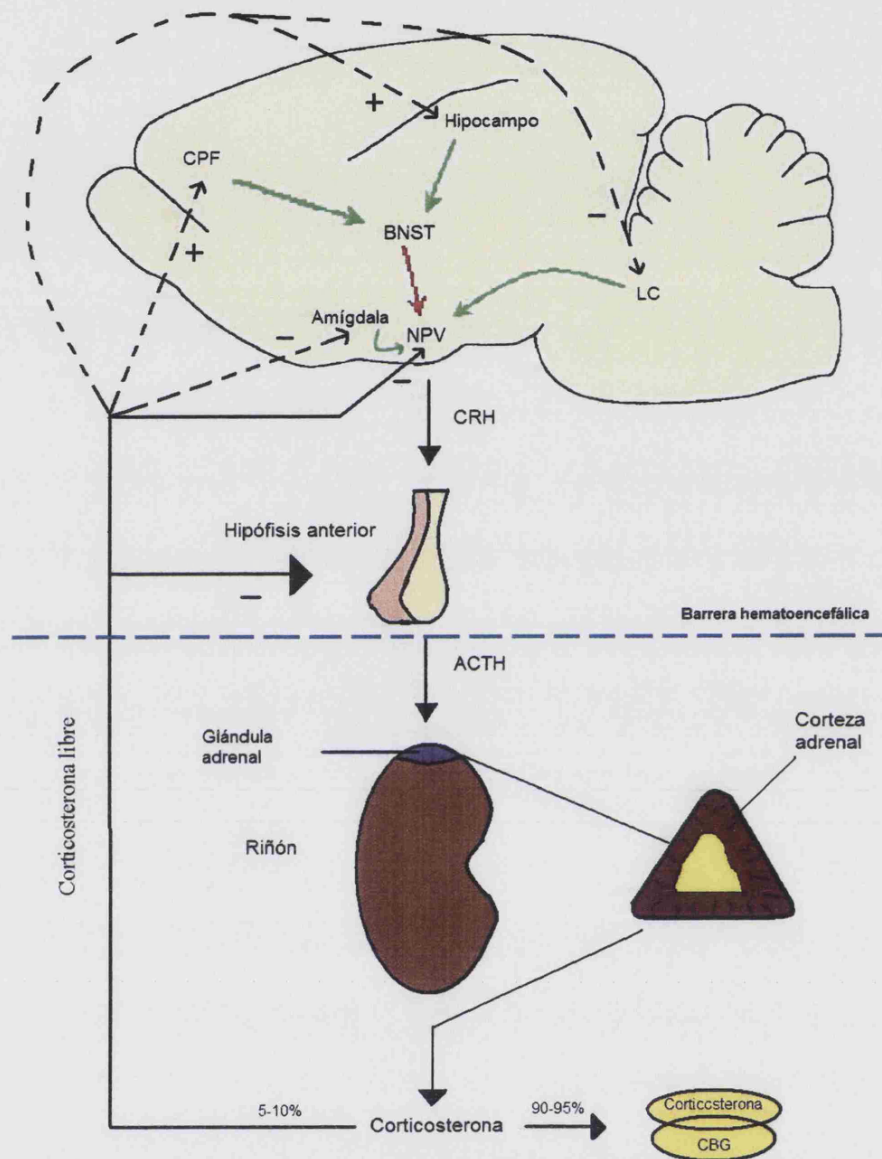


Figura 8. Representación esquemática de la regulación del eje HHA. Abreviaturas: NPV: núcleo paraventricular; BNST: núcleo del lecho de la estría terminal; LC: *locus coeruleus*; CBG: proteína transportadora de glucocorticoides. En verde se representan vías excitadoras cerebrales y, en rojo, vías inhibitoras. Los signos + y - representan los efectos de los glucocorticoides sobre su propia liberación.

4.2. Respuesta neuroquímica al estrés.

El estrés no sólo incrementa la actividad del eje HHA, sino que promueve la activación de diversas respuestas neuroquímicas que contribuyen a la restauración de la homeostasis del organismo y al procesamiento cognitivo del estímulo estresante. El cerebro es, de hecho, el órgano clave en la puesta en marcha y organización de la respuesta a estrés (McEwen 2000).

La CPF es un área que muestra una clara respuesta neuroquímica ante la presencia de un estímulo estresante. De hecho, el estrés incrementa los niveles de dopamina, acetilcolina, noradrenalina y serotonina en la CPF (Mark *et al.*, 1996; Hains y Arnsten 2008). Nos centraremos, sin embargo, en la dopamina, acetilcolina y el glutamato por ser el objeto de estudio del presente trabajo.

Los trabajos clásicos de Thierry *et al.*, (1976) mostraron que el estrés activa el área tegmental ventral, lo que da lugar a un incremento de la concentración de dopamina y de sus metabolitos HVA y DOPAC en la CPF. Posteriormente, muchos otros trabajos han mostrado ese mismo incremento de la actividad dopaminérgica en la CPF en respuesta a estrés, empleando diversos agentes estresantes (Abercrombie *et al.*, 1989; Finlay *et al.*, 1995; Feenstra *et al.*, 1995; Del Arco y Mora 2001a; Sullivan y Gratton 2002). El estrés también incrementa la neurotransmisión dopaminérgica en otras áreas relacionadas con la CPF, como son el hipocampo o el núcleo accumbens (Imperato *et al.*, 1989; Imperato *et al.*, 1991; Feenstra *et al.*, 1998). Algunos autores consideran que estos incrementos de dopamina en respuesta a estrés en la CPF constituyen una estrategia de “alto nivel” para hacer frente al estrés (Sullivan y Gratton 1998).

El estrés también incrementa la liberación de acetilcolina en la CPF en respuesta a diferentes tipos de estrés agudo (Rosenblad y Nilsson 1993; Mark *et al.*, 1996; Day *et al.*, 2001). Asimismo, el estrés también incrementa la liberación de acetilcolina en el hipocampo y el núcleo accumbens (Mark *et al.*, 1996; Thiel *et al.*, 1998). Estos cambios en la neurotransmisión colinérgica producidos por estrés se han relacionado con la modulación de la atención selectiva (Dalley *et al.*, 2004; Sarter y Parikh 2005).

Se ha sugerido que la CPF podría controlar a su vez la activación de los núcleos mesencefálicos que se produce en respuesta a estrés, especialmente el núcleo del rafe dorsal y el área tegmental ventral (Robbins 2005b). También podría ser importante el control de la CPF sobre el núcleo basal magnocelular para el procesamiento de la respuesta a estrés dado que la acetilcolina participa en algunas funciones relacionadas con las desempeñadas por la dopamina en la CPF, como la atención o la activación general (*arousal*) (Dalley *et al.*, 2004;Sarter *et al.*, 2009).

Otro neurotransmisor estudiado con respecto a la respuesta a estrés en la CPF es el glutamato. Diversos estudios electrofisiológicos han mostrado que el estrés incrementa la actividad del sistema glutamatérgico en la CPF (Yuen *et al.*, 2009;Musazzi *et al.*, 2010). Con respecto a los trabajos que han evaluado, mediante microdiálisis, el efecto del estrés sobre la concentración extracelular de glutamato en la CPF, algunos trabajos han mostrado un incremento de ésta (Moghaddam 1993;Bagley y Moghaddam 1997), mientras que otros no han encontrado dicho incremento de glutamato en respuesta a estrés en la CPF (Timmerman *et al.*, 1999;Del Arco y Mora 2001b). Es importante a este respecto tener en cuenta las limitaciones que presenta la técnica de microdiálisis para evaluar las concentraciones de glutamato sináptico (ver Discusión de Métodos).

4.3. Efectos conductuales del estrés.

El estrés, a través de los cambios producidos tanto sobre la neuroquímica como sobre la actividad del eje HHA en diversas áreas cerebrales como la CPF, el hipocampo o la amígdala, ejerce una actividad moduladora sobre diversos procesos cognitivos, como la memoria y el aprendizaje.

En cuanto a la actividad del eje HHA, se ha sugerido que los niveles de CORT guardan una relación de U invertida con los niveles de aprendizaje en diversas tareas, entre las que se encuentran el laberinto acuático (*water maze*) y el laberinto acuático radial (Sandi *et al.*, 1996;Park *et al.*, 2006)(ver Figura 9). Estos resultados sugieren que existen unos niveles óptimos de CORT para los cuales los niveles de aprendizaje son máximos, mientras que niveles inferiores de CORT (por ej., tras adrenalectomía o bloqueo de GRs) o superiores (por ej., mediante inyecciones de dosis altas de agonistas de los GRs o niveles altos de estrés) afectarían de forma negativa al aprendizaje. Sin

embargo, los efectos positivos del estrés sobre el aprendizaje no han sido muy estudiados. Por ejemplo, en un trabajo de Sandi *et al.* (1997) se mejoró el aprendizaje de las ratas de un laberinto acuático reduciendo la temperatura del agua a 19°C, de modo que se incrementaban los niveles de CORT de las ratas y este incremento correlacionaba positivamente con una mejora en el aprendizaje en la tarea. Por otro lado, Park *et al.*, (2006) han encontrado esta misma relación en forma de U invertida con la ayuda de agonistas y antagonistas de CORT y diversos tipos de estrés empleando un laberinto radial acuático. También se ha visto que otros procesos relacionados con la memoria, como la inducción de LTP en neuronas de CA1 presenta esta misma relación en forma de U invertida con las concentraciones de CORT (Jöels *et al.*, 2008). Asimismo, otros trabajos han mostrado que la CORT sería necesaria para la consolidación y el recuerdo de memorias de tipo emocional, a través de su acción conjunta con la noradrenalina sobre la amígdala, aunque en este caso parece que la relación entre aprendizaje y niveles de CORT podría ser lineal (Roozendaal *et al.*, 2006; Hains y Arnsten 2008).

Son más numerosos, sin duda, los trabajos que muestran un efecto negativo del estrés sobre el aprendizaje o la memoria. En algunos de estos trabajos se ha relacionado directamente a la CORT liberada en respuesta a estrés con esos déficits (Parker *et al.*, 2006; Pakdel y Rashidy-Pour 2007; Sandi y Pinelo-Nava 2007; Gourley *et al.*, 2008), pero en la mayoría de ellos también se relacionan esos déficits con las alteraciones que el estrés produce sobre los distintos sistemas de neurotransmisión. Un ejemplo interesante en este sentido se encuentra en el trabajo de Woodson *et al.* (2003), que mostraron que dos estímulos estresantes cualitativamente diferentes pero que producían el mismo incremento de CORT (exposición a un gato, frente a la exposición a una hembra receptiva) diferían en su efecto sobre la memoria de trabajo espacial. Así, la exposición al gato incrementó los errores en la prueba de memoria mientras que la exposición a la hembra receptiva no lo hizo. Los autores sugerían que la distinta cualidad del estímulo estresante activaría diferentes vías de neurotransmisión en diferentes áreas cerebrales que serían las que explicarían las diferencias observadas en el efecto de los dos tipos distintos de estrés. Otros autores también han llamado la atención sobre esta diferencia entre estímulos estresantes negativos (restricción del movimiento, choque eléctrico, exposición a un depredador, etc), que tienden a ser evitados, y estímulos estresantes positivos (ejercicio físico voluntario, actividad sexual,

consumo de alimentos de alta palatabilidad, etc), que tienden a ser buscados (Fox *et al.*, 2006;Ulrich-Lai y Herman 2009).

Los trabajos más numerosos son aquellos que emplean estímulos estresantes que producen déficits en pruebas que evalúan la memoria de trabajo (Murphy *et al.*, 1996;Diamond *et al.*, 1996;Arnsten y Goldman-Rakic 1998;Bats *et al.*, 2001;Park *et al.*, 2008). Más concretamente, se ha sugerido que los déficits producidos por estrés sobre la memoria de trabajo se deben a las alteraciones que éste produce sobre la actividad dopaminérgica en la CPF (Goldman-Rakic 1995;Murphy *et al.*, 1996;Arnsten y Goldman-Rakic 1998;Chudasama y Robbins 2004). Se ha sugerido que los niveles de activación de los receptores D1 de dopamina serían determinantes en la regulación de la memoria de trabajo por parte de la CPF (Zahrt *et al.*, 1997;Goldman-Rakic *et al.*, 2000;Mizoguchi *et al.*, 2004;Williams y Castner 2006). De hecho, como ya se ha mencionado previamente existiría una relación en forma de U invertida entre los niveles de activación de los receptores D1 de dopamina en la CPF y la eficacia en la realización de tareas que requieren el empleo de la memoria de trabajo. Así, tanto bajos niveles de activación de estos receptores (producidos por lesiones de neuronas dopaminérgicas o por la aplicación de antagonistas de los receptores D1) (Brozoski *et al.*, 1979;Murphy *et al.*, 1996;Romanides *et al.*, 1999) como altos niveles de activación de los mismos (producidos por estrés o altas dosis de agonistas de los receptores D1) (Murphy *et al.*, 1996;Zahrt *et al.*, 1997;Arnsten y Goldman-Rakic 1998) producen déficits sobre la memoria de trabajo. De hecho, los déficits producidos por estrés pueden ser revertidos mediante la administración local en la CPF de antagonistas de los receptores D1 (Murphy *et al.*, 1996;Arnsten y Goldman-Rakic 1998)(ver Figura 9).

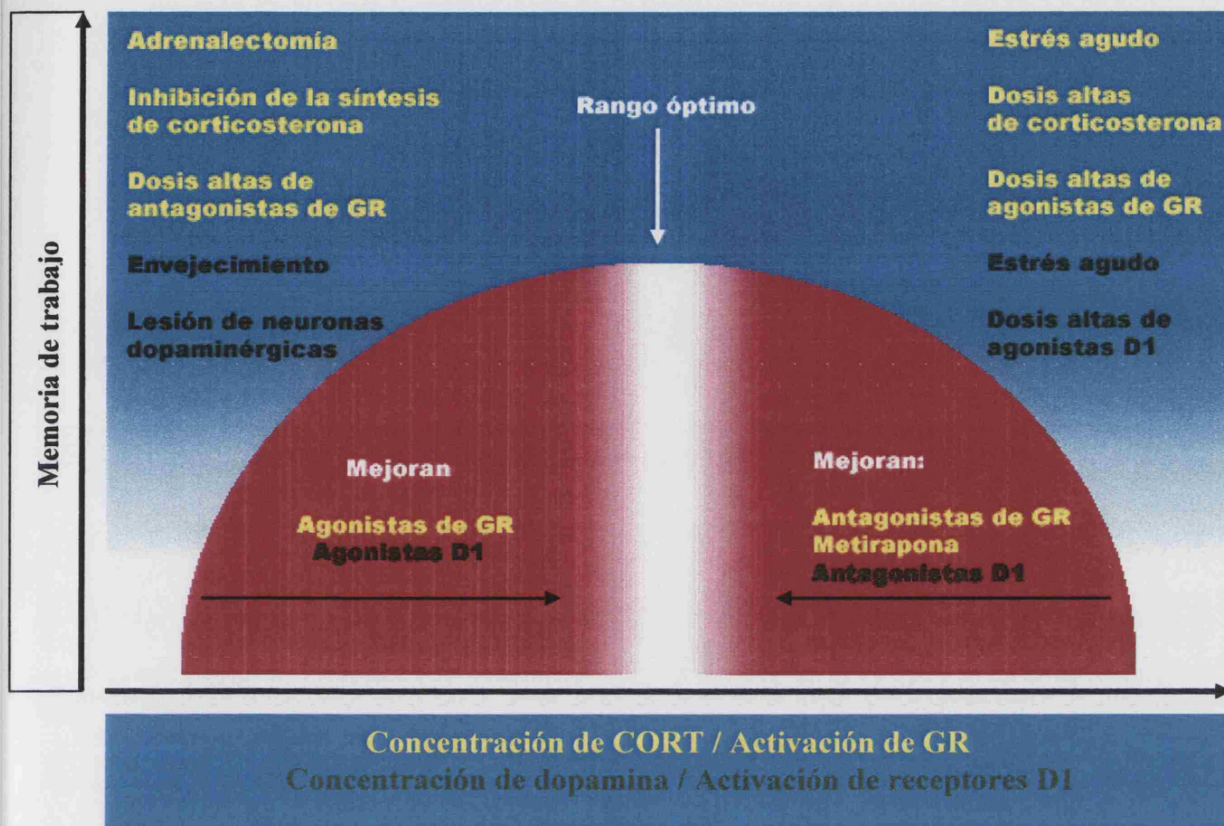


Figura 9. Esquema que muestra la relación en forma de U invertida entre la concentración de CORT (o la activación de sus receptores GR) (en amarillo) o de la liberación de dopamina en la CPF (o la activación de los receptores D1 prefrontales) (en verde) y la eficacia en la realización de una prueba de memoria de trabajo (Williams y Castner 2006).

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Las condiciones ambientales en las que vive un individuo y los estilos de vida que desarrolla a lo largo de su vida moldean su conducta y su capacidad de adaptación ante estímulos externos, así como su susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades psiquiátricas o neurodegenerativas (Nithianantharajah y Hannan 2006; Holmes y Wellman 2009; Goel y Bale 2009). Estos efectos tienen lugar a través de la modulación de la plasticidad neuronal, lo que implica cambios en la estructura y función cerebrales. Una vía experimental para estudiar los fenómenos de plasticidad dependientes de las condiciones ambientales es el modelo de enriquecimiento ambiental (EA) (Mora *et al.*, 2007).

El EA es una modificación de las condiciones habituales de los animales de laboratorio que se define como una combinación compleja de estímulos tanto físicos como sociales (van Praag *et al.*, 2000). El mantenimiento de animales en estas condiciones da lugar a un mayor volumen cerebral y una mayor arborización dendrítica (Kolb y Whishaw 1998; Diamond 2001) y produce cambios en diferentes sistemas de neurotransmisión, entre ellos el dopaminérgico (Winterfeld *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2005), colinérgico (Park *et al.*, 1992; Rosenzweig y Bennett 1996) y glutamatérgico (Rampon *et al.*, 2000b; Segovia *et al.*, 2006). Estos cambios anatómicos y neuroquímicos producidos por el EA conducen a su vez a cambios en la función de circuitos neuronales que se expresan en la conducta, dando lugar a una mejor memoria espacial y de trabajo (Kempermann *et al.*, 1997; Meléndez *et al.*, 2004; Segovia *et al.*, 2006). Se ha sugerido que los cambios producidos por el EA sobre la plasticidad cerebral podrían atenuar y retrasar los efectos negativos del envejecimiento cerebral y de las enfermedades neurodegenerativas (van Praag *et al.*, 2000; Diamond 2001). En consecuencia, la presente Tesis Doctoral se centró en el estudio de la acción del EA sobre los cambios que el envejecimiento produce sobre el cerebro.

El envejecimiento puede definirse como una pérdida progresiva de funciones motoras, sensoriales y cognitivas que son consecuencia de los cambios degenerativos que tienen lugar con la edad (Mora y Porras 1998). En general, el proceso de envejecimiento no produce una pérdida sustancial de neuronas (Haug y Eggers 1991; Rapp y Gallagher 1996; Morrison y Hof 1997), aun cuando sí da lugar a una hipertrofia de los árboles

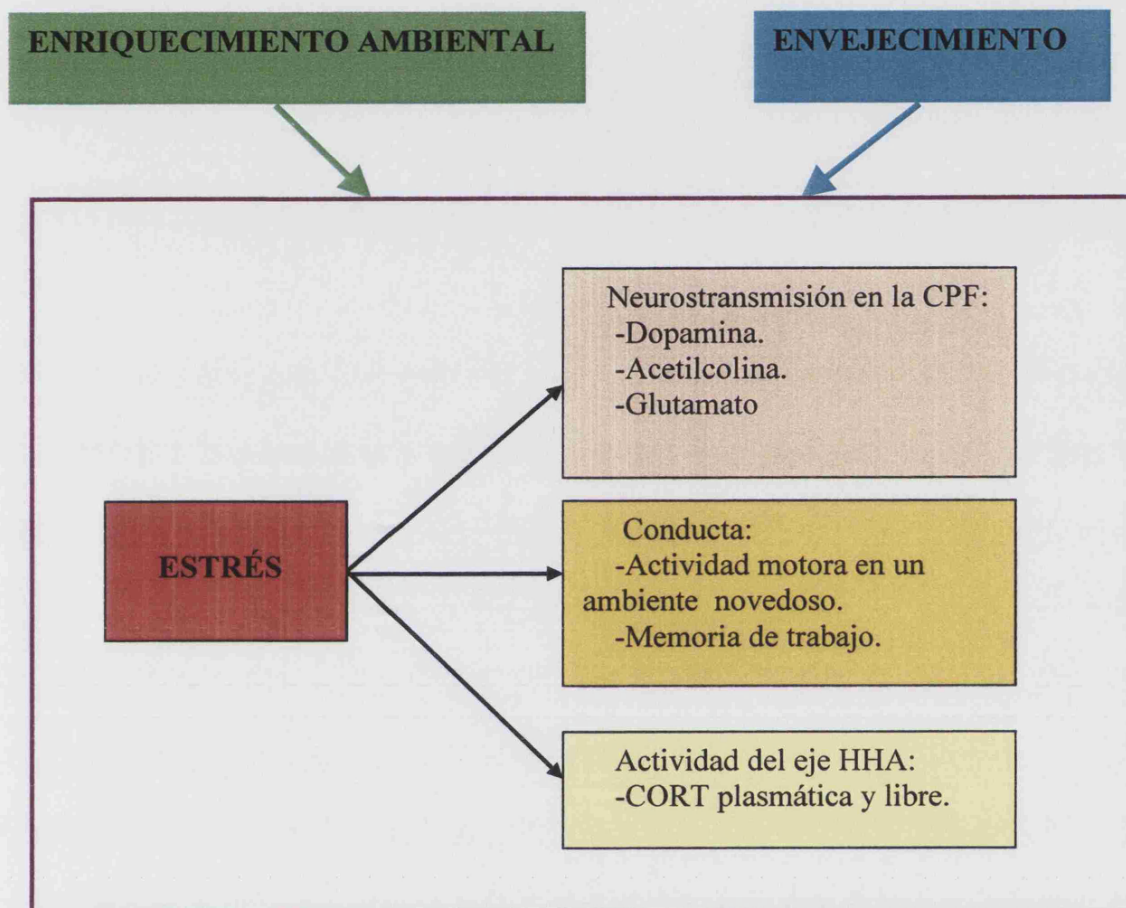
dendríticos en ciertas áreas cerebrales, que se ha interpretado como un efecto compensatorio con respecto a la pérdida de los mismos en otras neuronas (Coleman y Flood 1986; Finch 1993; Mora y Porras 1998). Además, el envejecimiento da lugar a cambios en parámetros de diferentes sistemas de neurotransmisión, como el dopaminérgico (Makman 1993; Bäckman *et al.*, 2006), el colinérgico (Decker 1987; Bartus 2000), o el glutamatérgico (Segovia *et al.*, 2001). Estos cambios neuroanatómicos y neuroquímicos conllevan a su vez cambios conductuales, entre los que se encuentran una menor actividad motora en un ambiente novedoso (Emerich *et al.*, 1993; Crawford y Levine 1997) y una menor memoria espacial y de trabajo (Frick y Fernandez 2003; Mizoguchi *et al.*, 2009b). Se ha propuesto que estos cambios podrían estar asociados a una disfunción en la respuesta a estrés en los individuos envejecidos, tanto a nivel neuroquímico (Del Arco y Mora 2001a), como hormonal (Sapolsky *et al.*, 1986; Lupien *et al.*, 2007).

La respuesta a estrés consiste en la activación de un conjunto de mecanismos neurales y hormonales que, de forma conjunta, contribuyen al restablecimiento de la homeostasis que ha sido o será potencialmente alterada por una determinada situación (agente estresante) (de Kloet *et al.*, 1999). Un área cerebral implicada en la regulación de la respuesta a estrés es la corteza prefrontal (CPF). El estrés incrementa la liberación de dopamina en esta área cerebral (Thierry *et al.*, 1976; Abercrombie *et al.*, 1989; Feenstra *et al.*, 1995; Del Arco y Mora 2001), y ese incremento se ha relacionado con diversas funciones entre las que se encuentran la modulación del estado de alerta (Imperato *et al.*, 1991), la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Ikemoto y Goeders 1998), o la facilitación de otras respuestas del sistema límbico (Hains y Arnsten 2008). El estrés también incrementa la liberación de acetilcolina en la CPF (Imperato *et al.*, 1989; Mark *et al.*, 1996), y su incremento ha sido relacionado con procesos atencionales o de activación general (*arousal*) (Acquas *et al.*, 1996; Dalley *et al.*, 2004). Además, estos cambios neuroquímicos producidos por estrés en la CPF dan lugar a déficits en funciones en las que esta área cerebral parece jugar un papel relevante, como la memoria de trabajo (Murphy *et al.*, 1996; Arnsten 1998; Robbins y Roberts 2007). A pesar de que son escasos los datos relativos a los efectos del envejecimiento sobre la respuesta neuroquímica y conductual al estrés, sí se ha mostrado que el envejecimiento reduce la respuesta del sistema dopaminérgico al estrés en la CPF (Del Arco y Mora 2001), así como el número de fibras dopaminérgicas y los niveles basales de dopamina

en esta misma área cerebral (Luine *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1994). Esto último se ha relacionado con un deterioro de la memoria de trabajo (Mizoguchi *et al.*, 2009b). Por otro lado, el estrés activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), dando lugar a la liberación de corticosterona (CORT) desde las glándulas adrenales, que tras cruzar la barrera hematoencefálica alcanza diversas áreas cerebrales y entre ellas la CPF, donde regula en parte su propia liberación (Diorio *et al.*, 1993; Herman *et al.*, 2005; Radley *et al.*, 2006; de Kloet *et al.*, 2008). Esta función de la CPF es relevante para el proceso de envejecimiento, dado que se ha propuesto que en los animales viejos se produce una liberación de CORT plasmática incrementada tanto a nivel basal como en respuesta a estrés (Sapolsky *et al.*, 1984; Meaney *et al.*, 1992; Bizon *et al.*, 2001; Montaron *et al.*, 2006). Esto último daría lugar a daños en áreas cerebrales como la propia CPF o el hipocampo que, a su vez, producirían los déficits cognitivos asociados a la edad (Sapolsky *et al.*, 1986; Hibberd *et al.*, 2000; Herbert *et al.*, 2006). No se ha evaluado, sin embargo, la CORT en animales viejos directamente en el cerebro, lo que puede ser relevante en este contexto, dado que varios trabajos han sugerido que los niveles cerebrales de CORT podrían no reflejar los niveles observados en plasma (Little *et al.*, 2008; Droste *et al.*, 2009a).

Se ha sugerido que unas condiciones ambientales favorables, como el EA, podrían atenuar ciertos déficits asociados al envejecimiento, dado que el cerebro envejecido aún muestra capacidad plástica y, por tanto, puede verse modificado por las condiciones ambientales (Diamond 2001; Mora *et al.*, 2007). Así, el EA atenúa la reducción en el número de sinapsis que se observa en los animales envejecidos (Greenough *et al.*, 1986), incrementa algunas proteínas relacionadas con la liberación de neurotransmisores (Saito *et al.*, 1994; Frick *et al.*, 2003; Leal-Galicia *et al.*, 2008) y reduce los déficits mostrados por animales viejos en ciertas tareas que requieren memoria espacial (Frick y Fernandez 2003; Lores-Arnaiz *et al.*, 2006; Harburger *et al.*, 2007) o memoria a corto plazo (Soffié *et al.*, 1999). No se han estudiado sin embargo, los efectos del EA sobre la respuesta a estrés a lo largo de la edad, aunque algunos datos experimentales en animales jóvenes sugieren la idea de que el EA reduce la respuesta a estrés (Fox *et al.*, 2006). Así, se ha mostrado que el EA reduce la liberación de CORT en respuesta a diversos tipos de estrés (Moncek *et al.*, 2004; Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Mlynarik *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2009) y da lugar a una menor actividad motora en un ambiente

novedoso o inducida por drogas psicoestimulantes (Bardo *et al.*, 1995; Zimmermann *et al.*, 2001; Larsson *et al.*, 2002).



En base a todo lo anteriormente expuesto, la hipótesis de trabajo de la presente Tesis Doctoral fue que el EA reduce los efectos neuroquímicos, hormonales y conductuales del estrés y atenúa el efecto del envejecimiento sobre estos parámetros.

Los objetivos concretos del presente trabajo fueron:

1. Estudiar el efecto del EA sobre la neurotransmisión basal y estimulada por estrés agudo en la corteza prefrontal.
 - 1.1 Estudiar el efecto del EA sobre la concentración basal y estimulada por estrés de dopamina en la CPF de animales de 6, 15 y 24 meses de edad.
 - 1.2 Estudiar el efecto del EA sobre la concentración basal y estimulada por estrés de acetilcolina en la CPF de animales de 6, 15 y 24 meses de edad.
 - 1.3 Estudiar el efecto del EA sobre la concentración basal y estimulada por estrés de glutamato en la CPF de animales de 6, 15 y 24 meses de edad
2. Estudiar el efecto del EA sobre la conducta motora y cognitiva:
 - 2.1. Estudiar el efecto del EA sobre la actividad motora espontánea en un ambiente novedoso (campo abierto) en animales de 6, 15 y 24 meses de edad.
 - 2.2. Estudiar el efecto del EA sobre la realización de una prueba de memoria de trabajo (laberinto acuático en forma de T) en animales de 6, 15 y 24 meses de edad.
3. Estudiar el efecto del EA sobre la concentración de CORT libre basal y en respuesta a estrés agudo en la corteza prefrontal y sobre la liberación de CORT plasmática basal.
 - 3.1. Estudiar el efecto del EA sobre la concentración de CORT plasmática basal en animales de 6, 15 y 27 meses de edad.
 - 3.2. Estudiar el efecto del EA sobre la concentración de CORT libre basal y estimulada por estrés en la CPF de animales de 6, 15 y 27 meses de edad.
 - 3.3. Estudiar el efecto del envejecimiento sobre la concentración basal y estimulada por estrés de CORT plasmática y CORT libre en la CPF y el hipocampo de animales de 6 y 27 meses de edad en condiciones estándar.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.ANIMALES.

Se emplearon ratas Wistar macho adultas (Harlan Ibérica). Todos los animales se mantuvieron a una temperatura ambiente constante de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ y en ciclo invertido de 12 horas luz/oscuridad (luces encendidas a las 20:00 horas).

Dado que las condiciones de los animales fueron diferentes en función de los experimentos realizados, se detallan a continuación las mismas, atendiendo en los casos que conviene a los objetivos señalados en la página 52.

En el caso de los experimentos correspondientes a los objetivos 1 y 2, los animales, a su llegada al laboratorio (3 meses de edad), fueron separados en dos grupos experimentales: enriquecimiento ambiental (EA) y control. Las condiciones de EA consistieron en la introducción de 10-12 animales en jaulas de metacrilato de grandes dimensiones (120x100x60cm), en las que contaron con bebida y comida *ad libitum*. En la jaula se introdujeron, renovándolos semanalmente, diversos objetos (pelotas, botellas de cristal, canutos de cartón, piezas de plástico de juegos de construcción), tuberías (cuya disposición también fue modificada semanalmente) y dos ruedas para la realización de ejercicio físico voluntario (ver Figura 1). Los animales en condiciones control se mantuvieron en jaulas estándar individuales de Plexiglas (55x35x20cm) con comida y bebida *ad libitum*. Los animales mantenidos en estas condiciones fueron manipulados una vez a la semana por motivos de limpieza de las jaulas. Los animales fueron mantenidos en sus respectivas condiciones ambientales desde los 3 hasta los 6, 15 ó 24 meses de edad, dando lugar a los tres grupos de edad estudiados (que corresponden a ratas adultas jóvenes, de edad media y viejas, respectivamente). Todos los experimentos de neuroquímica y conducta se realizaron durante el período de oscuridad (período activo de la rata).

Los animales empleados para llevar a cabo los objetivos 3.1 y 3.2. (estudio del efecto del EA y el envejecimiento sobre la concentración plasmática basal de CORT y sobre la concentración de CORT libre en la CPF en respuesta a estrés) fueron ratas Wistar macho de 3, 12 y 24 meses de edad, que se dividieron en dos grupos experimentales: EA y Control (condiciones como las descritas anteriormente). Los animales fueron mantenidos en esas condiciones durante 3 meses, por lo que las edades finales de los grupos fueron 6, 15 y 27 meses.

Los animales empleados para llevar a cabo el objetivo 3.3. (estudio del efecto del envejecimiento sobre la concentración de CORT plasmática y CORT libre en CPF e hipocampo) fueron ratas Wistar macho de 6 y 27 meses de edad, que se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio (3-4 animales por jaula, sin objetos en la misma).

Todos los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio siguieron las regulaciones españolas para la protección de animales de laboratorio (RD1201/2005).



Figura 1. Fotografía de una jaula de EA empleada en el presente trabajo de investigación.

2.EXPERIMENTOS DE PERFUSIÓN *IN VIVO*.

2.1.Construcción de implantes.

Los experimentos de microdiálisis se llevan a cabo mediante la inserción de una cánula de microdiálisis (ver punto 2.2) en la región cerebral objeto de estudio gracias a un sistema bilateral de cánulas guía que se confecciona en nuestro laboratorio (Segovia *et al.*, 1997). La implantación de cánulas guía permite mayores períodos de recuperación tras la cirugía (en comparación con la implantación crónica de la cánula de microdiálisis), de modo que se minimizan los niveles de estrés y se contribuye a la expresión de patrones de

comportamiento normales en los animales operados para la microdiálisis (de Groote y Linthorst 2007).

Los sistemas de cánulas implantados constan de los siguientes elementos:

- dos piezas acoplables macho-hembra de metacrilato y nailon, respectivamente, fabricadas en el Taller de Asistencia Técnica a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid. La pieza de nailon presenta dos orificios en su base donde se insertan las cánulas guía, separados por una distancia que depende del área cerebral estudiada (CPF: 1.6mm; Hipocampo: 10mm). La pieza de metacrilato presenta también dos orificios, que encajan perfectamente con los de la pieza de nailon. Ambas piezas presentan, a su vez, un orificio en cada lateral que permite la inserción de un tornillo que asegura la inmovilización de la cánula de microdiálisis.
- dos cánulas de acero inoxidable (denominadas cánulas guía) de 902 μ m (20 ga) de diámetro externo y 660 μ m de diámetro interno. Su longitud es de 8mm.
- dos cánulas de acero inoxidable (denominadas fiadores) con un diámetro externo de 640 μ m (24 ga) y una longitud de 8.2mm.

Para la construcción del implante, las cánulas guía se insertan en los orificios practicados en la base de la pieza hembra y, para favorecer su fijación, se aseguran en su base mediante resina epoxi (Araldit®). Al implantar este conjunto en el cráneo de la rata se asegura la adecuada localización de la cánula de microdiálisis en el área cerebral objeto de estudio. Las cánulas guía permanecen ocluidas por los fiadores hasta el inicio del experimento de perfusión intracerebral, momento en el que se extraen estos y se inserta la cánula de microdiálisis.

2.2.Construcción de la cánula de microdiálisis.

El diseño de las cánulas de microdiálisis empleadas en este estudio procede de nuestro laboratorio (Segovia *et al.*, 1997). Para su fabricación se utiliza:

- un capilar de silica con 144 μ m de diámetro externo y 75 μ m de diámetro interno y una longitud de 55mm.
- una cánula de acero inoxidable de diámetro externo (23ga) y 10mm de longitud.

- una cánula de acero inoxidable de 458 μ m de diámetro externo (26ga), 254 μ m de diámetro interno y 45mm de longitud.
- el extremo final de una punta de pipeta.
- membrana de diálisis de cuprofano con un diámetro de 200 μ m, una longitud de 4mm y un tamaño de exclusión molecular de 5000Da (Hospal, España).

Los pasos para la construcción de una cánula de microdiálisis son los siguientes: a) se introduce el capilar de silica a través de una cánula de 23ga y se fija mediante pegamento (Super-Glue-3®, Loctite) de modo que la silica sobresalga 1mm por uno de los extremos; b) se acoda la cánula de 26ga a una longitud aproximada de 30mm con un ángulo de cercano a 40°, se realiza un orificio con ayuda de una lima a la altura del codo originado, se introduce el extremo de mayor longitud de la silica a través del orificio practicado en el codo de la cánula de 26 ga sin que la cánula de 23 ga llegue a contactar con el orificio, y se tapona dicho orificio mediante pegamento (Super Glue gel-3®, Loctite); d) se inserta la punta de pipeta a través del extremo inferior de la cánula de 23ga y se hace ascender hasta que encaja en el codo de la cánula, y a continuación se rellena la punta de pipeta con pegamento (Super Glue-3®, Loctite); se pasa la cánula de 20ga sobre el extremo corto de la cánula de 23ga y se fija con pegamento a 0.3mm del extremo; se corta el extremo de la silica bajo una lupa de modo que sobresalgan 4.5mm de silica por el extremo de la cánula de 23ga. Se introduce la membrana de diálisis dejando un espacio de 0.5mm entre el extremo de la silica y el de la membrana de diálisis. Ambos extremos se sellan con pegamento (Super Glue-3®, Loctite). La longitud final de las cánulas se ajusta mediante la inserción en la cánula de 23ga, por debajo de la punta de pipeta, de una sección de polietileno de 20ga. Este paso ajusta la medida para que la cánula de microdiálisis alcance con precisión el área cerebral de interés, para lo cual es necesaria una longitud de 16.5mm en el caso de la CPF (ver Figura 2).

Para proceder a la inserción de la cánula de microdiálisis en el tejido cerebral: a) se introduce el extremo de ésta a través uno de los orificios de la pieza macho (correspondiente al hemisferio sobre el que se vaya a desarrollar el experimento) procurando que la membrana quede protegida en el interior de dicha pieza; b) se acopla la pieza macho sobre la pieza hembra y se hace descender lentamente la cánula de

microdiálisis a través de la cánula guía hasta la profundidad adecuada. Finalmente se asegura la fijación de la cánula mediante un tornillo lateral (ver Figura 3).

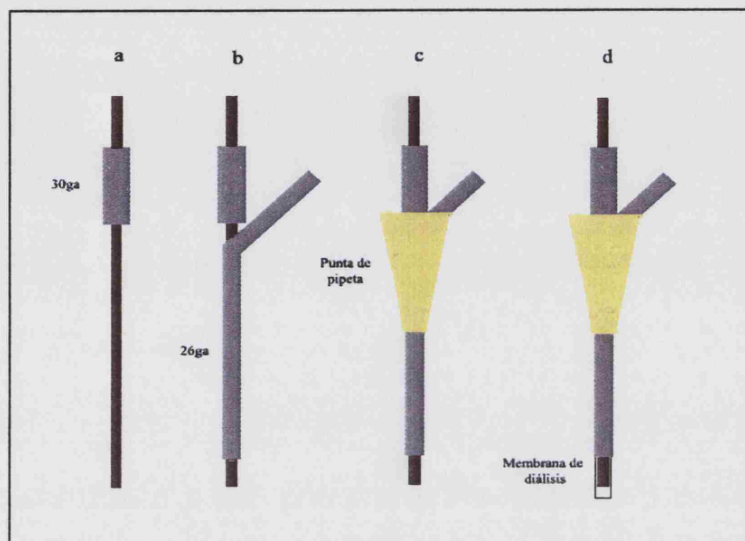


Figura 2. Esquema de los pasos necesarios para la construcción de la cánula de microdiálisis (véase texto).

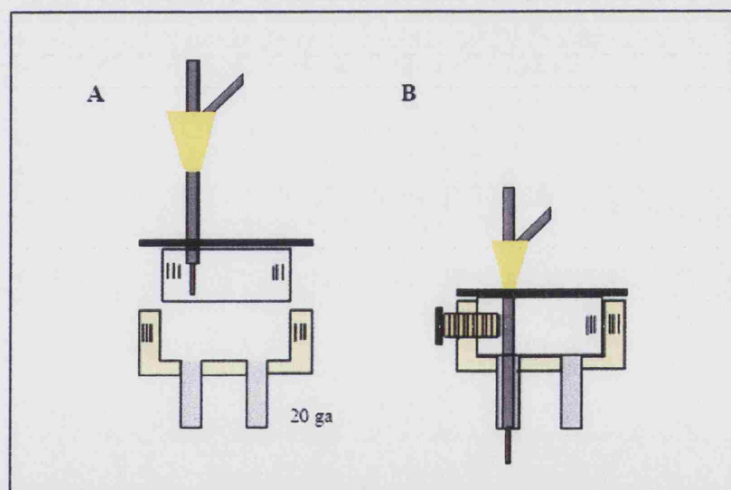


Figura 3. Esquema de los pasos necesarios para la inserción de la cánula de microdiálisis (véase texto).

2.3. Cirugía estereotáxica.

Consiste en la colocación, mediante un aparato estereotáxico, del implante para perfusión intracerebral en la cabeza del animal. Previamente a la operación se anestesió al animal mediante inyección intraperitoneal de Equithesin (2ml/kg). El Equithesin se preparó en nuestro laboratorio, añadiendo de forma secuencial a 49.4 ml de etanol absoluto (Scharlau,

España) 21.25g de hidrato de cloral (Sigma, España), 4.86g de pentobarbital sódico (Sigma, España) disueltos previamente en 21ml de agua bidestilada, 198ml de 1,2-propilenglicol (Merck, Alemania), 10.63g de sulfato magnésico (Merck, Alemania), disueltos previamente en 50ml de agua bidestilada y se enrasó la solución final hasta 500ml con agua bidestilada. La solución se conservó a temperatura ambiente en un recipiente opaco y cerrado.

Tras inducir anestesia profunda al animal (pérdida del reflejo corneal), se rasuró la zona de la operación con ayuda de una maquinilla eléctrica para cortar el pelo (Andis Company, Estados Unidos) y se procedió a la operación de implantación del sistema bilateral de cánulas guía. Tanto el instrumental quirúrgico como el implante se mantuvieron durante la intervención en una solución antiséptica de benzalconio (Armil 1:1000).

La inserción del implante se realiza como sigue: se coloca al animal en el aparato estereotáxico para roedores (David Kopf Instruments 900, Estados Unidos) fijando el maxilar superior a 3mm por debajo de la línea interaural; mediante una incisión longitudinal en la piel de la cabeza con un bisturí (Aesculap® BB515, Alemania) se deja al descubierto la calota del animal; se abre el campo mediante pinzas hemostáticas y, tras controlar la hemorragia secundaria al corte del tejido con ayuda de pequeños fragmentos de Espongostan Film® (Ferrosan, Dinamarca), se localiza el punto Bregma (punto de coincidencia entre las suturas frontoparietal e interparietal). Este punto se utiliza para calcular las coordenadas del eje anteroposterior y del eje lateral, según el Atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson 1998). Una vez calculadas las coordenadas y corregidas en el estereotáxico para la adecuada posición del implante se hace descender éste hasta que las cánulas guía toquen la calota y se toma la coordenada del eje de profundidad. A continuación se retira el implante de la zona de operación y se procede a la realización de 3 orificios (uno anterior y dos posteriores con respecto a la futura posición del implante) donde se emplazarán los tornillos de fijación (1mm de diámetro) (AgnTho's AB, Suecia).. Después se realizan otros dos orificios, a través de los cuales pasarán las cánulas guía del implante de perfusión intracerebral. Los orificios se realizan mediante un taladro dental DESK 300IN (Silfraden, Italia), con una broca de 1mm de diámetro (Meisinger, Alemania). A continuación se vuelve a situar el implante en las coordenadas adecuadas y se hace descender. Las coordenadas empleadas fueron diferentes en función del área objeto de estudio: CPF: rostral: +3.2mm; lateral; 0.8mm; profundidad:-2mm; Hipocampo ventral:

rostral: -5.6mm; lateral: 5.0mm; profundidad: -3.4mm (ver Figuras 11 y 12). Una vez colocado el implante se fija a la calota con resina autopolimerizable Dentalon Plus® (Heraeus Kulzer, Alemania) de forma que queden incluidos en ella los tornillos de fijación y la base del implante. Antes de retirar al animal del estereotáxico se introducen los fiadores en las cánulas guía para evitar su oclusión por hemorragia o restos de tejido. Tras la operación quirúrgica se controla el peso del animal y el estado de la herida.

2.4.Sistema de perfusión intracerebral *in vivo*.

La microdiálisis es una técnica de perfusión intracerebral que permite la recogida de sustancias químicas presentes en el espacio extracelular (Robinson y Justice 1991). El procedimiento consiste en la perfusión continua de líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs) a través de una cánula de microdiálisis. La cánula recoge las sustancias químicas presentes en el espacio extracelular atravesando la membrana dialítica de la misma a favor de gradiente de concentración. De este modo se obtienen las muestras (perfundidos), que posteriormente se separarán en las distintas fracciones deseadas para ser analizadas.

Los experimentos de microdiálisis se llevaron a cabo 6-7 días tras la cirugía y siempre durante la fase oscura del ciclo luz/oscuridad (comienzo de los experimentos: 9-10am). El LCRs que se empleó en los experimentos estaba compuesto por: NaCl: 137mM; CaCl₂: 1.2mM; KCl: 3mM; MgSO: 1mM; NaH₂PO₄: 0.5mM; NaHPO₄: 2mM y glucosa: 3mM, todo ello diluido en agua bidestilada, con un pH=7.2.

Dado que tanto las concentraciones de dopamina como acetilcolina en la CPF son reducidas, se añadieron al LCRs un inhibidor de la recaptura de dopamina (nomifensina) y un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (neostigmina), que permiten incrementar los niveles basales de estos neurotransmisores para facilitar su detección cromatográfica (Consolo *et al.*, 1987;Butcher *et al.*, 1991;Damsma y Westerink 1991;Santiago *et al.*, 1993). Se empleó una concentración de neostigmina (Sigma, Alemania) de 1μM y una concentración de nomifensina (Sigma, Alemania) de 5μM, que entran de los rangos empleados en la bibliografía.

Los experimentos comenzaron con la preparación del sistema de perfusión (Figura 4), que consta de los siguientes elementos:

- una bomba de infusión Harvard 22.
- dos jeringas Hamilton de 1 ml.
- una válvula Harvard HV 4-4 de cuatro vías.
- un soporte giratorio o *swivel* de dos canales TCS 2-23 (AgnTho's AB, Suecia) que se une, por un lado, a un brazo articulado (que se ancla a la caja de microdiálisis) y, por otro, al sistema de anclaje que porta el animal.
- tubos de etileno propileno fluorizados (FEP Teflon®, AgnTho's AB, Suecia) con diámetro externo de 23ga.
- adaptadores para tubos FEP (AgnTho's AB, Suecia).

El primer paso para la realización de los experimentos de microdiálisis consiste en la sujeción ligera del animal, tras la cual se procede a la retirada de los fiadores que bloquean las cánulas guía del implante del animal. A continuación, y previamente a la inserción de la cánula de microdiálisis, se inicia la perfusión de LCRs a través de la cánula con el fin de crear una presión hidrostática sobre la membrana que proporcione la rigidez adecuada para evitar así su colapso durante la inserción a través de la cánula guía. A continuación se introduce la cánula de microdiálisis a través de la cánula guía correspondiente (como se ha descrito anteriormente). Una vez insertada la cánula se fija al implante mediante un tornillo perpendicular al implante (ver Figura 3). Por último se ancla el animal al *swivel* gracias a un enganche que se acopla a un “cinturón” de plástico flexible colocado previamente al animal y que le permite moverse libremente (ver Figura 4).

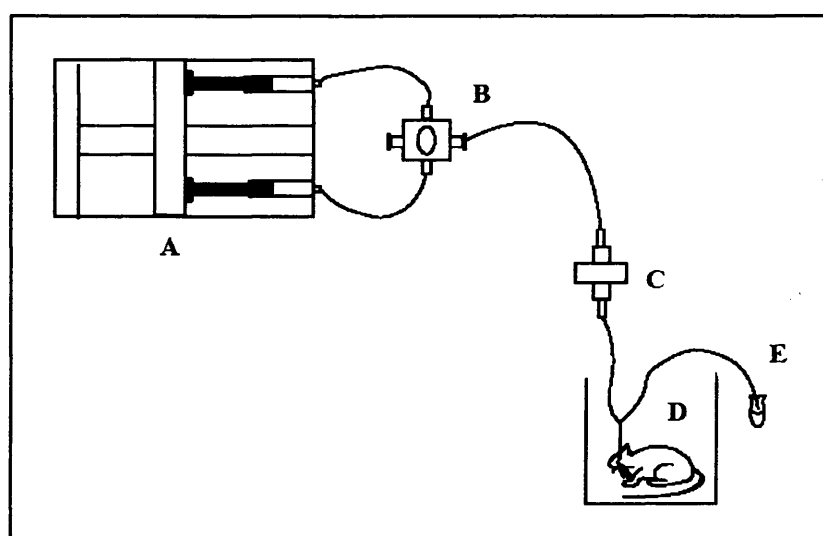


Figura 4 .Esquema del sistema de microdiálisis empleado. (A) Bomba de perfusión; (B) Válvula de 4 vías; (C) Swivel; (D) Cánula de microdiálisis; (E) Recogida de la muestra.

La perfusión se realizó a un flujo de 2µl/min gracias a una válvula Harvard HV (4-4) recogiendo una muestra cada 20 min (40µl/muestra). Las muestras obtenidas se separaron en alícuotas antes de ser almacenadas a -80°C: 6µl para la detección de glutamato, 10µl para la detección de acetilcolina y 20µl para la detección de dopamina. En los experimentos donde se evaluó la CORT libre, se separaron alícuotas de 15µl para su posterior cuantificación.

2.5. Protocolo de perfusión y estrés.

El diseño del protocolo de perfusión en estos experimentos fue como sigue (Tabla 1):

- Período de *estabilización* de 180min que comienza tras la inserción de la cánula de microdiálisis y durante el cual no se recogieron muestras. Este período es necesario para que las concentraciones extracelulares de los neurotransmisores se estabilicen tras la inserción de la cánula en el tejido cerebral.
- Período *control* de 60min durante el cual se recogieron tres muestras que sirvieron posteriormente para determinar los niveles basales de los neurotransmisores y la CORT, que se establecieron como control con respecto al resto de muestras (ver Estadística).
- Período de *restricción del movimiento* del animal (estrés) de 40 min. Se restringió manualmente el movimiento del animal, prestando especial atención a que éste no se levantara sobre sus patas traseras.
- Período *post-estrés* de 140min durante el cual se analizaron los efectos de la restricción del movimiento sobre la concentración de los neurotransmisores.

Estabilización	Basal	Estrés	Post-estrés
180min	60min	40min	140min

Tabla 1. Protocolo de los experimentos de microdiálisis correspondientes al objetivo 1.

En el caso de los experimentos llevados a cabo en los objetivos 3.2 y 3.3, en los que se evaluó la concentración de CORT en la CPF y/o el hipocampo, el estrés consistió en la restricción del movimiento durante 20min, mediante el empleo de una tela provista de tiras de velcro con la que se enrolló al animal. El protocolo, en este caso, por tanto, fue como sigue:

Estabilización	Basal	Estrés	Post-estrés
180min	60min	20min	160min

Tabla 2. Protocolo de los experimentos de microdiálisis correspondientes al objetivo 3.

2.6. Análisis de neurotransmisores por cromatografía líquida de alta resolución.

2.6.1. Detección de catecolaminas.

La detección de catecolaminas se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa acoplada a un detector electroquímico siguiendo el método empleado en nuestro laboratorio en estudios previos (Segovia *et al.*, 1997; Segovia y Mora 1998; Segovia *et al.*, 1999a). El volumen de muestra necesario para el análisis de catecolaminas fue de 20µl, que se inyectaron mediante un inyector automático refrigerado (4°C) (HP Series 1200, Hewlett-Packard, España), pasando a través de una columna C18 Nova-Pak® C18 (Waters, España), que presenta un tamaño de partícula de 4µm, 3.9mm de diámetro y 150mm de longitud.

2.6.1.1. Condiciones cromatográficas.

Para la separación de catecolaminas se empleó un sistema desgasificador de bombeo HP Series 1200 (Hewlett-Packard, España) de programa isocrático con un flujo constante de 1ml/min y una fase móvil que permite la detección de dopamina y de sus metabolitos ácido homovanílico (HVA) y ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) en aproximadamente 5.5min (ver Figura 5). Para preparar la fase móvil se requieren los siguientes reactivos:

- Metanol grado HPLC (Scharlau, España).
- Acetato sódico (Merck, Alemania)
- Ácido cítrico (Merck, Alemania).
- Sulfonato sódico (Scharlau, España).
- Ácido etildiaminotetraacético (EDTA) (Sigma, España).

La fase móvil consistió en una solución 82/12 (Zanassi *et al.*, 1999) de tampón acetato-citrato 0.1M y metanol grado HPLC. El tampón acetato-citrato se preparó disolviendo acetato sódico y ácido cítrico en agua MQ. A esta solución se añadió sulfonato sódico 2.9mM y EDTA 1mM (pH=3.48), ajustado con HCl 1N (Panreac Química S.A., España). Por último se filtró el tampón (filtros GSWP4700, poro 22µm, Millipore). Previamente a su utilización, la fase móvil se introdujo en un baño de sonicación de 15min para favorecer su

desgasificación. Cada fase móvil se mantuvo reciclando en el sistema de HPLC durante aproximadamente un mes.

La detección de las catecolaminas se realizó mediante un detector electroquímico Coulochem II, modelo 5200 (ESA, Estados Unidos), que consta de dos células analíticas (ESA 5011), la célula 1 o de oxidación fijada a +375mV, con una sensibilidad de 2 μ A, y la célula 2 o de reducción fijada a -250mV, con una sensibilidad de 1nA. Se emplearon dos células analíticas debido a la diferencia de concentraciones entre la dopamina (rango nM) y sus metabolitos (rango μ M), condiciones que dificultan su detección con una sola célula (ver Figura 5).

El cálculo de los tiempos de retención y cuantificación de las catecolaminas presentes en la muestra de perfundido se realizó mediante un programa informático (Millenium 32, Waters, España) siguiendo el método de estándar externo.

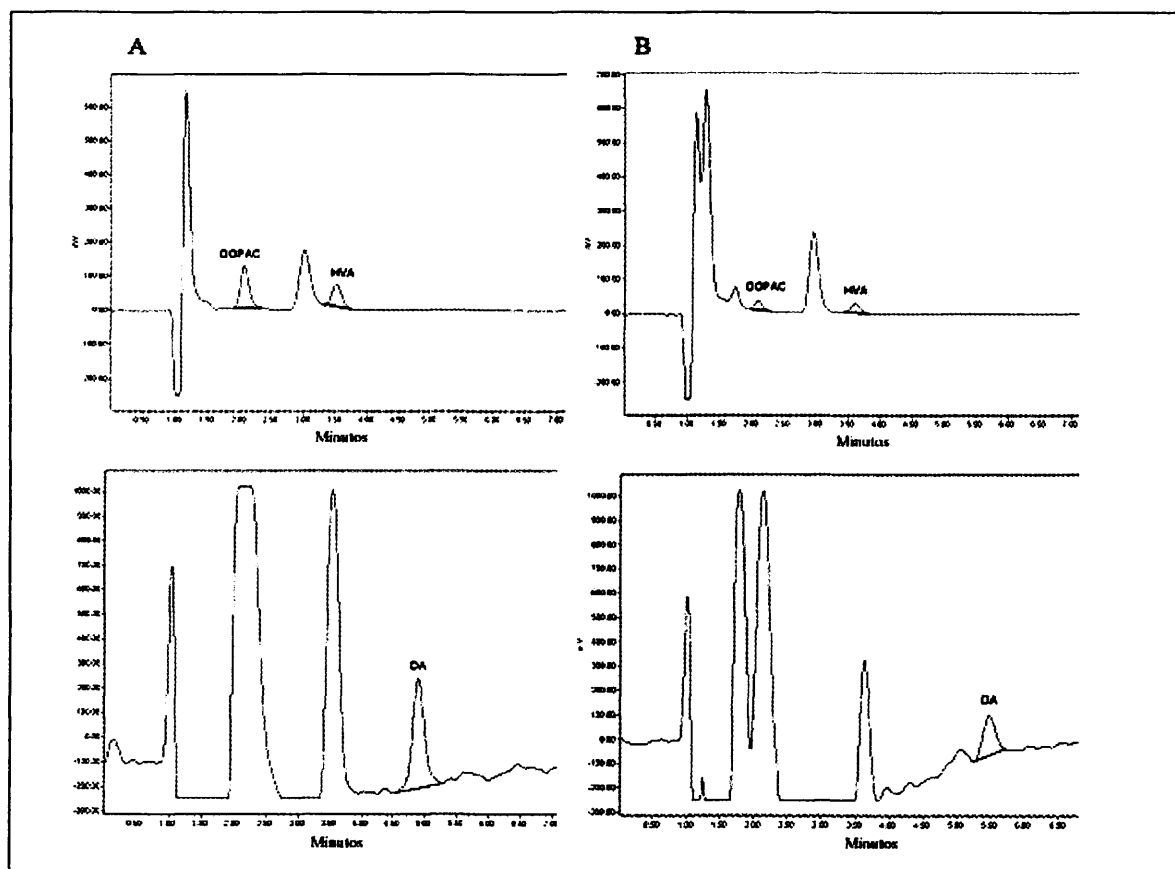


Figura 5. Ejemplo de cromatogramas obtenidos en las condiciones cromatográficas descritas en el texto. A: Patrón (1nM para dopamina, 100nM para DOPAC y HVA). B: Ejemplo correspondiente a una muestra de dializado de un experimento de microdialísis. Arriba: célula 1 o de oxidación; abajo: célula 2 o de reducción. Abreviatura: DA: dopamina.

2.6.1.2.Calibración.

La calibración se llevó a cabo con el fin de insertar en el programa informático los valores de referencia del tiempo de retención, así como el factor de respuesta correspondiente a la dopamina. El tiempo de retención de una sustancia es el tiempo necesario para que dicha sustancia recorra completamente la columna de separación del cromatógrafo. El factor de respuesta de una sustancia pone en relación las concentraciones conocidas de esa sustancia con las áreas de los picos cromatográficos. Para llevar a cabo la calibración del cromatógrafo se inyectaron patrones con diferentes concentraciones de dopamina (0.5, 1, 2, 4, 10, 25 y 50nM). Su límite de detección fue de 0.15nM.

2.6.1.3.Cálculo del coeficiente de variación.

Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectan en el cromatógrafo 6 alícuotas de una solución patrón 1nM de dopamina. Puesto que estas inyecciones son realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas han de ser debidas a la variabilidad propia del método. Los coeficientes de variación (CV) obtenidos para la dopamina se expresan en la Tabla 3:

n	Media (nM)	S	CV
6	0.98	0.11	11.59

Tabla 3. Coeficiente de variación de dopamina empleando el método descrito; n, tamaño de muestra; s, desviación estándar; CV, coeficiente de variación.

2.6.1.4.Linealidad del análisis cromatográfico.

Para determinar la linealidad del método de análisis cromatográfico utilizado se inyectaron soluciones patrón con concentraciones variables y conocidas de las catecolaminas a analizar. La representación gráfica de la relación entre el área bajo la curva de cada catecolamina (eje de ordenadas) y la concentración inyectada (eje de abscisas) se ajustó a una línea recta (Figura 6).

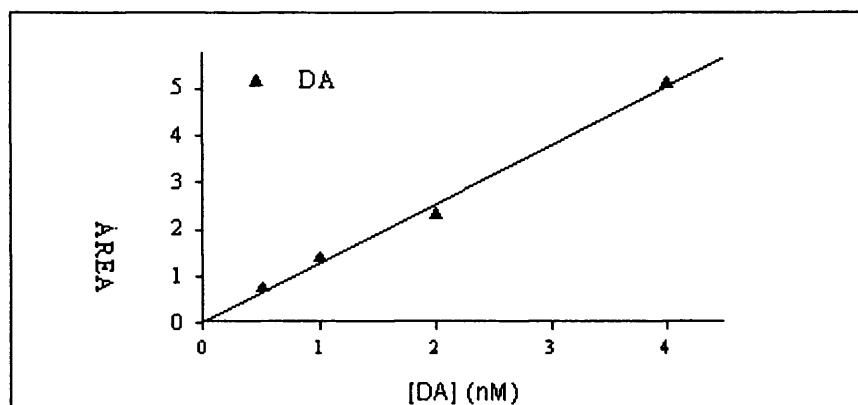


Figura 6. Curva de linealidad obtenida para la dopamina bajo las condiciones cromatográficas descritas.

2.6.2.Detección de acetilcolina.

El contenido de acetilcolina presente en las muestras recogidas del medio extracelular *in vivo* fue analizado mediante HPLC de intercambio iónico acoplada a detección electroquímica (Hernández *et al.*, 2003). El volumen de muestra utilizado fue de 10 μ l, que se inyectaron mediante un inyector automático refrigerado (4°C) (HP 1100 Series, Hewlett-Packard, España), pasando a través de una columna microbore (UniJet microbore ACh/Ch analytical column, BAS, Estados Unidos), que presenta un tamaño de partícula de 10 μ m, 1mm de diámetro y 530mm de longitud. A continuación de la columna se dispuso el reactor enzimático (UniJet microbore ACh/Ch IMER, BAS, Estados Unidos) de dimensiones 50 x 1 mm y tamaño de partícula de 10 μ m, en cuyo interior se produce la hidrólisis de acetilcolina en colina y acetato mediante la enzima acetilcolinesterasa y posteriormente, la colina, por acción de la enzima colina-oxidasa, se hidroliza a peróxido de hidrógeno y betaína. La detección del peróxido de hidrógeno se lleva a cabo mediante un detector Electrochem (modelo HP1049A, Hewlett-Packard, España) que contiene un electrodo de platino (BAS, Estados Unidos), fijado a un potencial de oxidación de +500mV.

2.6.2.1.Condiciones cromatográficas.

Para la separación de la acetilcolina se empleó un sistema desgasificador de bombeo (autoinyector HP 1100 Series, Hewlett-Packard, España) de programa isocrático con un flujo constante de 0.15 ml/min y una fase móvil que permite la detección de acetilcolina y colina en aproximadamente 10min. La fase móvil fue un tampón fosfato cuya

composición fue la siguiente:

- Agua ultrapura (sistema de purificación Milli-Q Plus.®, Millipore);
- Sodio di-hidrógeno fosfato (Panreac Química S.A., España) 50 mM;
- Ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) 0.5 mM.

Con el fin de evitar el crecimiento bacteriano en el sistema cromatográfico, se añadió el bacteriostático ProClin® 150 Reagent (BAS, Estados Unidos), 5ml por litro de tampón. Por último se ajustó el pH de la solución a 8.5 con NaOH puro (Merck, Alemania). Antes de recorrer el sistema de cromatografía, la fase móvil fue filtrada (filtros GSWP4700, poro 22µm, Millipore).

Con estas condiciones cromatográficas el tiempo de retención de la ACh fue de 6.5 min, mientras que el de colina fue de 8.5 min. Los datos cromatográficos fueron procesados mediante el software HPChemStation (Hewlett-Packard, España). La Figura 7 muestra un ejemplo de cromatogramas correspondientes a un patrón y a una muestra problema obtenidos bajo las condiciones descritas en las que se analizaron la acetilcolina y la colina.

2.6.2.2. Calibración.

Para crear la tabla de calibración fue necesario proporcionar al software: 1) el tiempo de retención del pico correspondiente a cada compuesto inyectado; 2) la concentración de cada componente inyectado. Para el análisis de acetilcolina, se realizó una calibración de 6 niveles, inyectando muestras patrón a las concentraciones de 10-25-50-100-200-500 nM. El límite de detección bajo las condiciones descritas fue de 5nM.

2.6.2.3. Cálculo del coeficiente de variación.

Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectan en el cromatógrafo 6 alícuotas de una solución patrón 50nM de acetilcolina. Puesto que estas inyecciones son realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas han de ser debidas a la variabilidad propia del método. Los coeficientes de variación (CV) obtenidos para la acetilcolina se expresan en la Tabla 4:

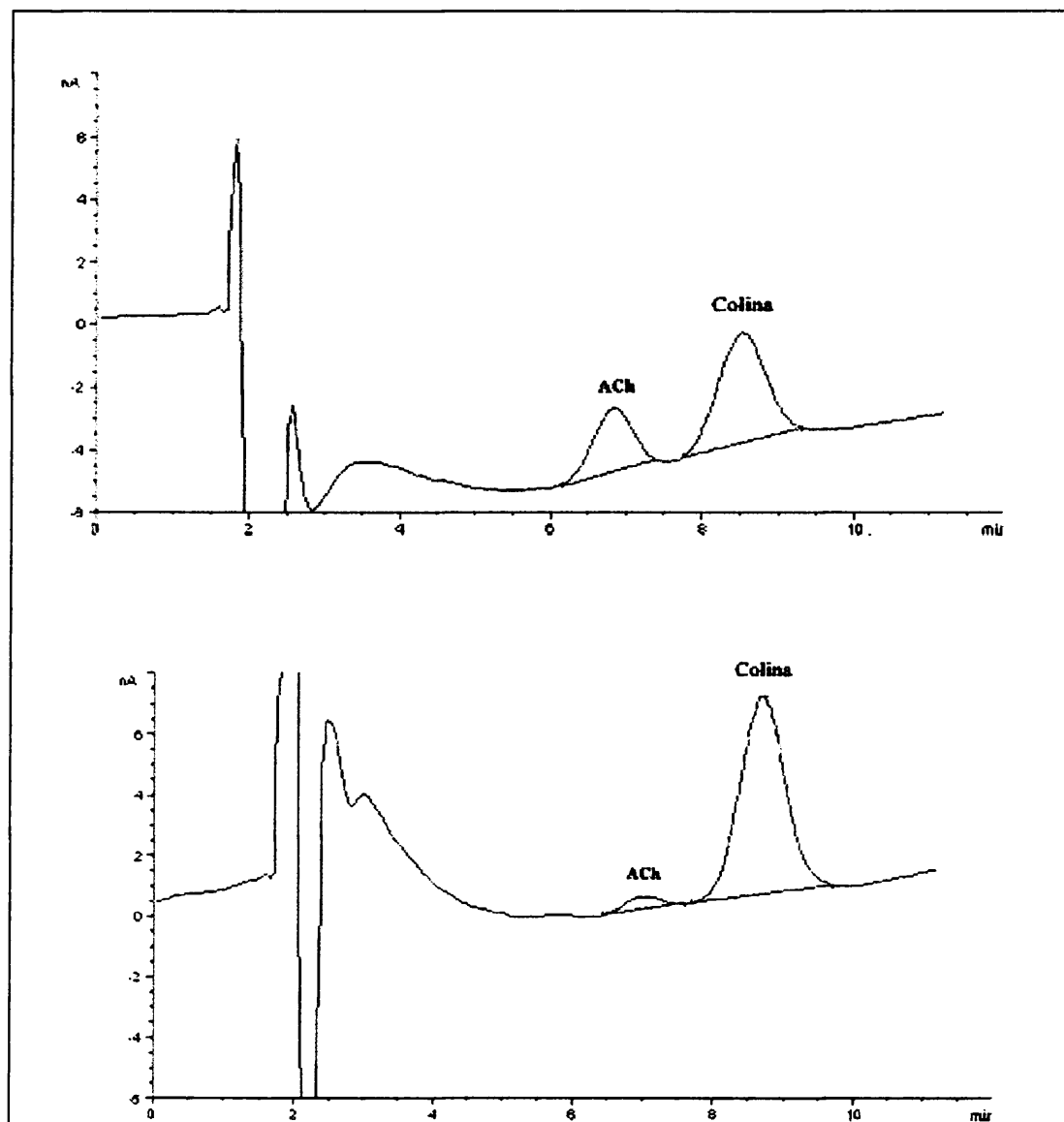


Figura 7. Ejemplo de cromatogramas obtenidos en las condiciones cromatográficas descritas en el texto. Arriba:: Patrón (50nM para acetilcolina, 250nM para colina. Abajo: Ejemplo correspondiente a una muestra de perfundido de un experimento de microdiálisis. Abreviatura: ACh: acetilcolina.

n	Media (nM)	S	CV
6	56	3.97	7.05

Tabla 4. Coeficiente de variación de acetilcolina empleando el método descrito; n, tamaño de muestra; s, desviación estándar; CV, coeficiente de variación.

2.6.2.4. Linealidad del análisis cromatográfico.

Para determinar la linealidad del método de análisis cromatográfico utilizado se inyectaron en el cromatógrafo soluciones patrón con concentraciones variables de

acetilcolina y colina. La representación gráfica de la relación entre el área bajo la curva de la acetilcolina (eje de ordenadas) y la concentración inyectada (eje de abscisas) se ajusta a una línea recta (Figura 8).

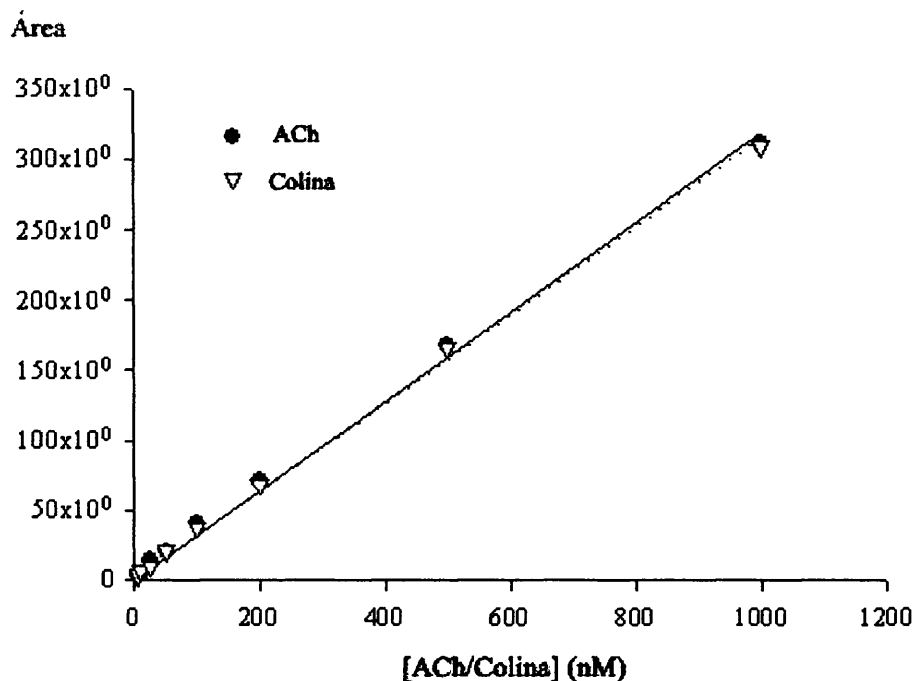


Figura 8. Curva de linealidad obtenida para acetilcolina y colina bajo las condiciones cromatográficas descritas.

2.6.3. Detección de aminoácidos (glutamato).

El análisis de aminoácidos se realizó mediante HPLC acoplada a un detector de fluorescencia (Waters, 474, Estados Unidos). Para llevar a cabo la cuantificación de los aminoácidos se realiza una derivación precolumna con el reactivo o-ftaldehído-3-mercaptopropiónico (OPA-3-mercaptopropiónico) de acuerdo con los métodos descritos previamente en el laboratorio (Segovia *et al.*, 1997; Segovia y Mora 1998; Segovia *et al.*, 1999b). La preparación de OPA-3-mercaptopropiónico requiere los siguientes reactivos:

- o-ftaldehído (OPA) (Sigma, Alemania).
- Ácido 3-mercaptopropiónico (Sigma, Alemania)
- Borato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Alemania).
- Metanol grado HPLC (Scharlau, España).

Se disuelven 32mg de OPA en 800 μ l de metanol, a los que se añaden 7140 μ l de una solución tampón de borato sódico 0.1M ajustada a un pH de 9.5. Posteriormente se añaden 54 μ l de ácido 3-mercaptopropiónico. La solución debe conservarse a temperatura ambiente en un frasco opaco y cerrado. El reactivo es preparado cada semana.

La derivación precolumna se realiza mediante la programación de un inyector automático refrigerado (4°C) (HP 1100 Series, Hewlett-Packard), que lleva a cabo los siguientes pasos: a la muestra de 6 μ l se le añaden 6 μ l de estándar interno (homoserina 6.25 μ M). Posteriormente se añaden 10 μ l del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico. Al cabo de 1min se añaden 5 μ l de ácido acético al 5% con el fin de reducir el pH de la reacción y detenerla. Finalizada la derivación, se realiza la inyección de la muestra que pasa por una columna Spherisorb ® ODS-2 (Phase Separations) con un tamaño de partícula de 5 μ m, un diámetro de 4.6mm y una longitud de 150mm.

2.6.3.1. Condiciones cromatográficas.

Con el fin de lograr una separación entre picos bien definida, se empleó un programa de gradientes de dos fases móviles con un flujo constante de 1ml/min. Los reactivos empleados en la preparación de las dos fases móviles fueron los siguientes:

- Agua ultrapura obtenida de un sistema de purificación Mili-Q Plus ® (Milipore) y filtrada posteriormente (filtro de 0.45 μ m de poro, Milipore).
- Alcohol isopropílico grado HPLC (Scharlau, España).
- Metanol grado HPLC (Scharlau, España).
- Tampón acetato sódico 4M (Sigma, España).
- NaOH en lentejas (Merck, Alemania).
- Ácido acético (Merck, Alemania).

La fase móvil A consiste en una solución 95/5 (Zanassi *et al.*, 1999) de tampón acetato sódico 50mM y metanol, a la cual se le añaden 12.5ml de alcohol isopropílico por cada litro de mezcla. El tampón acetato sódico se prepara a partir de una solución de acetato sódico 4M, ajustada a un pH de 5.67 con NaOH y ácido acético glacial, y posteriormente filtrada (filtro de 0.45 μ m, Milipore). La fase móvil B es una solución 70/30 (Zanassi *et al.*, 1999) de metanol y agua. Previamente a su utilización, ambas soluciones se introdujeron en

un baño de sonicación durante 15min para su desgasificación. Durante el proceso de análisis, la desgasificación se realizó mediante un flujo de helio de 10ml/min.

Se estableció un programa de gradiente de paso de ambas soluciones, presentado en la Tabla 5. Los primeros 16min de este programa son el tiempo de análisis de la muestra y los 4min siguientes permiten recuperar las condiciones iniciales.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Fase A	Fase B
0.00	1.00	90	10
9.00	1.00	52	48
12.00	1.00	0	100
16.00	1.00	0	100
16.01	1.00	90	10
20.00	1.00	90	10

Tabla 5. Programa de gradientes para el análisis de aminoácidos.

La detección de los aminoácidos OPA-derivados se llevó a cabo mediante un detector de fluorescencia Waters 474 con un filtro de excitación de 340nm y un filtro de emisión de 460nm. El cálculo del tiempo de retención y la cuantificación de los aminoácidos se realizó mediante el programa informático Millenium 32 ® (Waters) siguiendo el método del estándar interno. Mediante este método se añade a todas las muestras una concentración conocida de una molécula que constituirá el estándar interno. La concentración de cada uno de los aminoácidos se obtiene mediante el cociente entre el área del pico correspondiente al aminoácido estudiado dividido por el área de estándar interno para cada una de las muestras. El estándar interno empleado fue homoserina. El tiempo de retención para el glutamato fue aproximadamente de 4.5 min (ver Figura 9).

2.6.3.2. Calibración.

La calibración se realizó con el fin de proporcionar al programa informático los valores de referencia de los tiempos de retención, así como la recta de calibración de cada aminoácido analizado. Para ello se prepararon soluciones patrón con cada uno de los aminoácidos analizados a partir de las soluciones madre. La calibración se realiza inyectando en el

cromatógrafo cinco patrones de concentraciones diferentes (0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20 μ M). El límite de detección fue de 0.05 μ M.

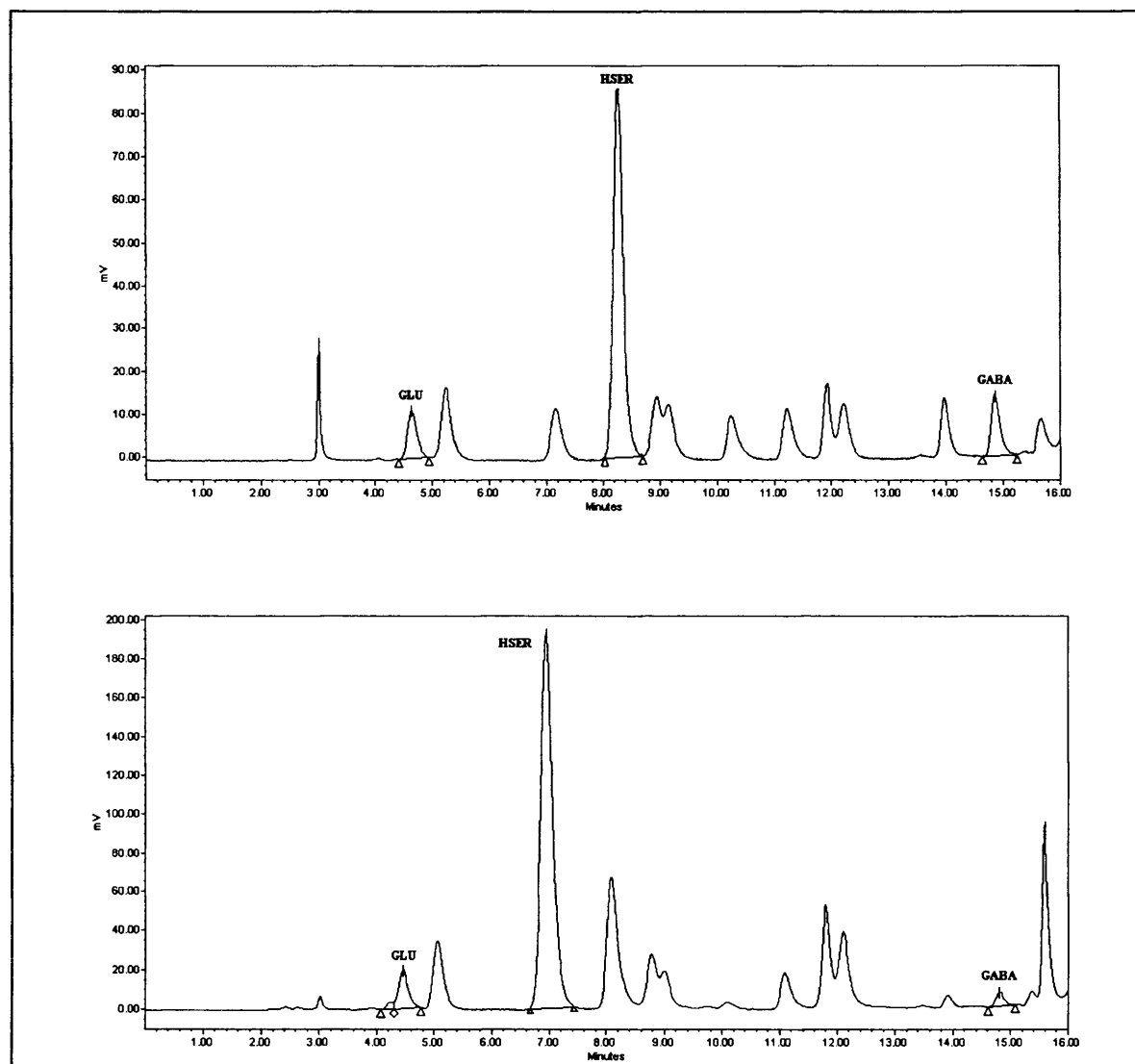


Figura 9. Ejemplo de cromatogramas obtenidos en las condiciones cromatográficas descritas en el texto. Arriba:: Patrón (1 μ M para cada uno de los aminoácidos,). Abajo: Ejemplo correspondiente a una muestra de perfundido de un experimento de microdiálisis. Abreviaturas: GLU: glutamato; HSER: Homoserina.

2.6.3.3.Cálculo del coeficiente de variación.

Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectan en el cromatógrafo 6 alícuotas de una solución patrón 1 μ M. Puesto que estas inyecciones fueron realizadas en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas han de ser debidas a la variabilidad propia del método. El coeficiente de variación (CV) obtenido para el glutamato se muestra en la Tabla 6:

	n	Media (μM)	S	CV
Glutamato	6	1.25	0.075	5.272

Tabla 6. Coeficiente de variación de glutamato con el método descrito; n, tamaño de muestra; s, desviación estándar; CV, coeficiente de variación.

2.6.3.4. Linealidad del análisis cromatográfico.

Para determinar la linealidad del método de análisis cromatográfico se inyectaron soluciones patrón con concentraciones variables de los aminoácidos a analizar. La representación gráfica entre el cociente área aminoácido/área de estándar interno (eje ordenadas) y la concentración de aminoácido (eje abscisas) se ajusta a una línea recta (Figura 10)

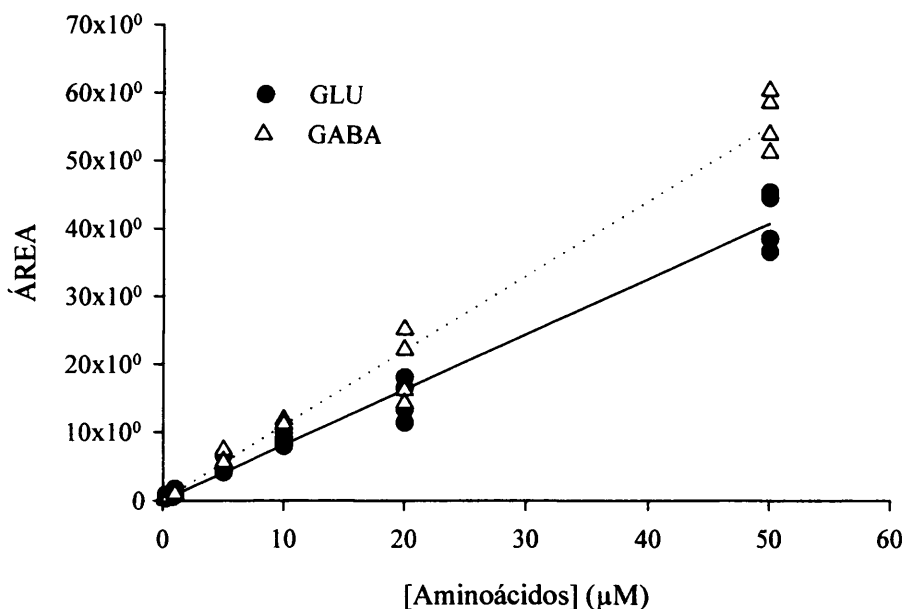


Fig.10 : Curva de linealidad obtenida para los aminoácidos glutamato y GABA bajo las condiciones cromatográficas descritas en el texto.

2.7. Verificación de la localización de la cánula de microdiálisis.

Una vez concluidos los experimentos de microdiálisis se sacrificó a los animales mediante una sobredosis de Equithesin. A continuación, tras perfusión intracardíaca mediante solución salina (NaCl 0.9%), seguida de paraformaldehído 4%, se extrajeron los cerebros, manteniéndolos en paraformaldehído durante la noche y pasándolos a tampón fosfato 0.1M hasta su posterior disección. Se realizaron cortes de los cerebros de $50\mu\text{m}$ de espesor mediante un criostato (Leica CM 1510S, Alemania). Las secciones se observaron mediante

una lupa de aumento (Zeiss Stemi 2000, Alemania). La posición aproximada de las cánulas se representa en las figuras 11 y 12 (CPF e hipocampo, respectivamente).

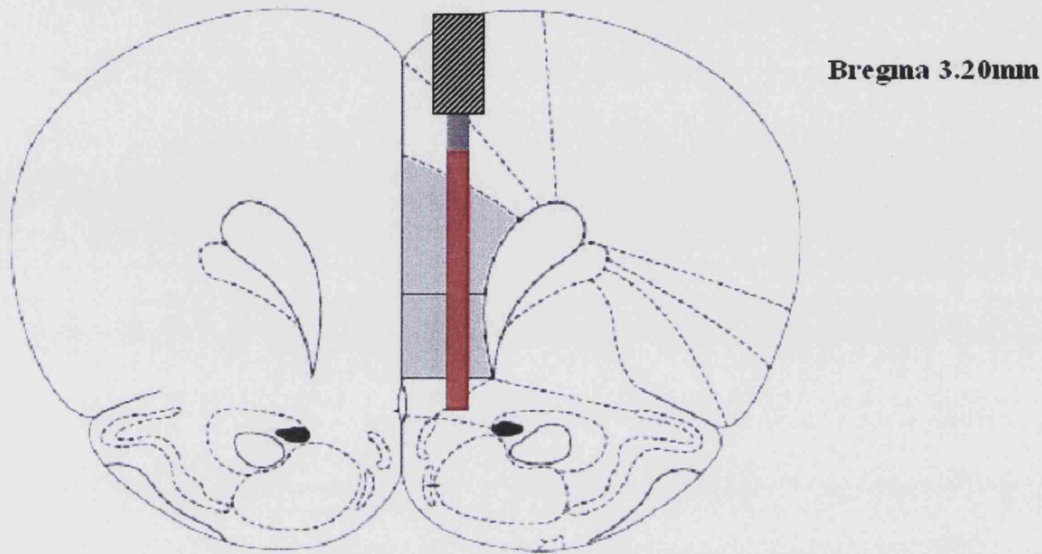


Figura 11. Representación esquemática de un corte coronal de un cerebro de rata. En gris claro se representan las áreas prelimbica (dorsal) e infralimbica (ventral) de la CPF (ver también Figura 1 de la Introducción). En rojo se representa el área aproximada ocupada por la membrana de la cánula de microdialisis. La fracción rayada representa la sección correspondiente a la cánula guía del implante y en gris oscuro se representa la porción metálica de la cánula que penetra en el cerebro del animal. Modificado de Paxinos y Watson (1998).

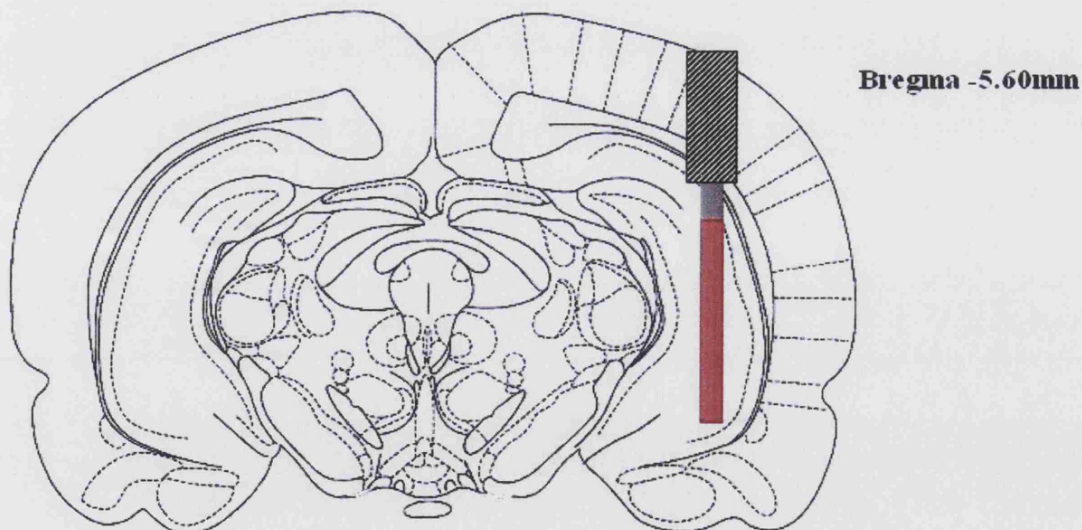


Figura 12. Representación esquemática de un corte coronal de un cerebro de rata. En rojo se representa el área aproximada ocupada por la membrana de la cánula de microdialisis (hipocampo ventral). La fracción rayada representa la sección correspondiente a la cánula guía del implante y en gris oscuro se representa la porción metálica de la cánula que penetra en el cerebro del animal. Modificado de Paxinos y Watson (1998).

3. Cuantificación de CORT mediante radioinmunoensayo.

El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica que se basa en la competencia entre una hormona marcada con un radioisótopo (^{125}I) y la misma hormona natural presente en la muestra por un anticuerpo altamente específico contra la hormona correspondiente (en nuestro caso, la CORT). Como las cantidades de hormona marcada y anticuerpo son siempre las mismas y lo que varía es la cantidad de hormona no marcada, después de un proceso en el que se separen la hormona libre de la unida a anticuerpo, cuanto mayor sea la cantidad de hormona fría (sin marcaje) menor será la fracción de hormona marcada unida al anticuerpo y, por tanto, menor la cantidad de radiactividad medida. De este modo, estableciendo una curva patrón con cantidades conocidas de hormona natural podemos deducir la cantidad de hormona fría existente en una muestra en función de la radiactividad unida al anticuerpo.

3.1. Cuantificación de CORT plasmática.

En el caso del objetivo 3.1. (estudio de los niveles basales de CORT plasmática en animales mantenidos en EA y condiciones control), las muestras de sangre fueron obtenidas mediante decapitación de los animales. En el caso del objetivo 3.3 (estudio de niveles basales y en respuesta a estrés de CORT plasmática en animales jóvenes y viejos) las muestras se obtuvieron mediante corte en el rabo. En ambos casos las muestras de sangre se recogieron en viales previamente heparinizados.

Las muestras se centrifugaron (10min, 10000rpm) y se retiró la fase correspondiente al plasma (sobrenadante). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Para llevar a cabo el análisis de la CORT plasmática se empleó un kit comercial (MP Biomedicals. Estados Unidos).

Para evaluar la concentración de CORT plasmática total de las muestras de sangre se siguieron los pasos que indica el protocolo del kit comercial. Las muestras se diluyeron 1/200 en un diluyente esteroide. A las muestras diluidas se les añadieron 200 μl de CORT ^{125}I y, a continuación, 300 μl de anti-CORT y se agitaron. Se incubaron las muestras durante 2h y se añadieron 500 μl de solución precipitante. Los tubos se agitaron y seguidamente se centrifugaron durante 15min a 1000g. Finalmente se aspiró

el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur acoplada a una bomba de vacío. Junto con las muestras analizadas se preparó una curva de calibración mediante patrones de CORT proporcionados por el kit (25ng/ml-1000ng/ml). Por último, tanto la curva de calibrado como las muestras se analizaron mediante un contador gamma. El contador mide, por tanto, la cantidad de hormona marcada que se haya unido al anticuerpo al competir con la CORT libre presente en las muestras. El software del sistema de cuantificación proporciona la curva estándar en la que representa en el eje de ordenadas (eje Y) el cociente B/B₀ (se definirá a continuación) y en el eje de abscisas (eje X) las concentraciones de los distintos patrones empleados para obtener la curva estándar (en escala logarítmica). El cociente B/B₀ se obtiene del siguiente modo:

$$B/B_0 = \frac{\text{cpm (patrón n)} - \text{cpm (NSB)}}{\text{cpm (patrón 0)} - \text{cpm (NSB)}}$$

siendo cpm (patrón n): las cuentas por minuto del patrón n.

cpm NSB: las cuentas por minuto de un tubo que mide la unión inespecífica (sólo se ha añadido al mismo el diluyente esteroide y la hormona marcada).

cpm (patrón 0): cuentas por minuto de un tubo al que no se añade muestra o patrón alguno, pero sí el resto de reactivos (mide la unión inespecífica en presencia del anticuerpo no marcado).

El software del sistema calcula la concentración de cada uno de los patrones de la curva en base a la pendiente de la curva y la varianza de los duplicados de cada muestra. Asimismo, si alguna de las muestras se aleja demasiado de su duplicado, el software lo elimina de la representación. Las muestras son calculadas interpolando el valor de cpm de cada una de ellas en la curva estándar (ver Figura 13).

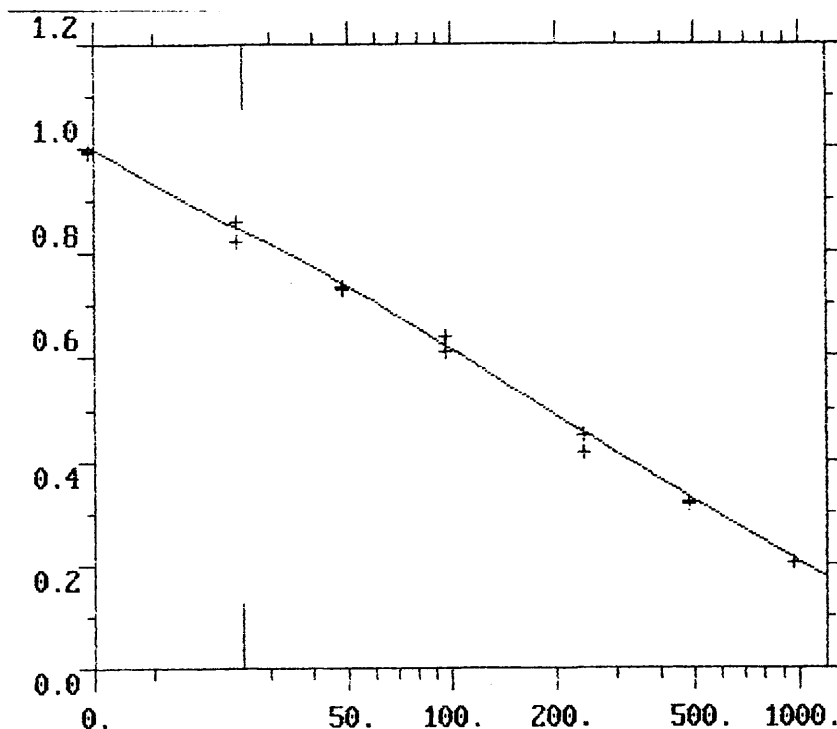


Figura 13. Ejemplo de curva estándar para cuantificar CORT en plasma.

3.2. Cuantificación de CORT libre en muestras de microdialísis.

Dado que en el cerebro no se encuentran las proteínas transportadoras de corticosterona, toda la CORT presente en el cerebro es CORT libre, que constituye en torno a un 5-10% de la CORT plasmática (Rosner 1990), por lo que su concentración es mucho más reducida que la de la CORT plasmática (CORT libre más la unida a proteínas). Además, no toda la CORT presente en el espacio extracelular atraviesa la membrana de la cánula de microdialísis, por lo que la concentración de CORT libre de los dializados es sensiblemente menor que la presente en muestras de plasma. Por ello, para incrementar la sensibilidad del kit comercial (diseñado para medir muestras de CORT plasmática) se redujo $\frac{1}{4}$ el volumen de hormona marcada y las muestras no se diluyeron. Con ello se facilitó la competitividad de la hormona fría. Además en la curva estándar se añadieron algunos puntos de menor concentración de CORT (6.25 y 12.5ng/ml mediante diluciones del patrón original de 25ng/ml). Los resultados obtenidos se corrigieron multiplicándolos por 200, dado que estas muestras no se diluyen, al contrario de lo que se hace con las muestras de plasma. Los niveles basales de CORT libre fueron bajos pero se encontraron por encima del nivel de detección. La Figura 14 muestra un ejemplo de curva estándar realizada para cuantificar muestras de dializados.

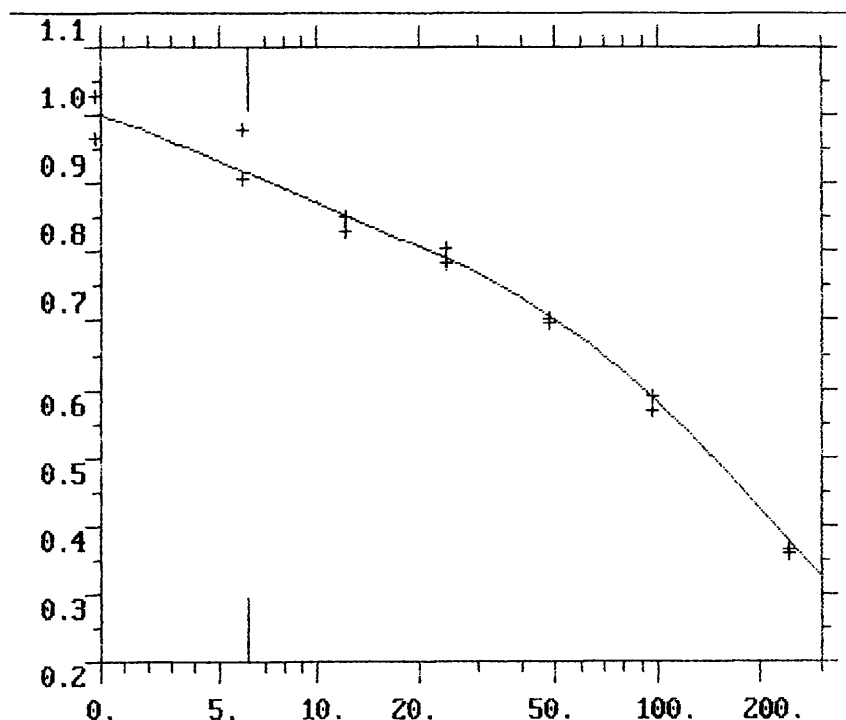


Figura 14. Ejemplo de curva estándar modificada para cuantificar CORT en muestras de dializado.

4.Evaluación de la actividad motora en un ambiente novedoso.

Se emplearon para ello dos aparatos de campo abierto (MED Associates Inc, VT, Estados Unidos). Cada campo abierto consiste en una caja cuadrada de Plexiglás (80x80x30cm) equipada con dos hileras de ocho células fotoeléctricas cada una situadas a 5 y 15cm de altura, que registran la actividad horizontal y vertical del animal (Figura 15). Los animales fueron colocados una sola vez en el centro del campo abierto y exploraron éste libremente durante 60min, durante los cuales se registraron las interrupciones de las células fotoeléctricas gracias a un programa informático (MED Associates Inc, VT, Estados Unidos).

El campo abierto se limpió cuidadosamente con etanol 70% antes de colocar a cada uno de los animales en el campo abierto para evitar la permanencia de restos olfativos que pudiesen alterar o guiar la actividad motora del siguiente animal evaluado.

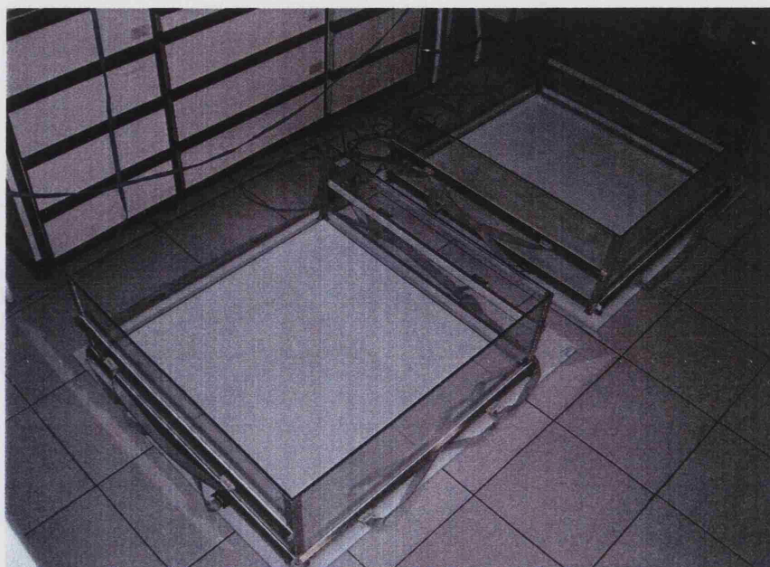


Figura 15. Fotografía de los aparatos de campo abierto empleados en el presente trabajo.

5. Evaluación de la memoria de trabajo mediante un laberinto acuático en forma de T.

5.1. Características generales.

Este método utilizado para evaluar la memoria de trabajo en un laberinto en forma de T es una adaptación del empleado por Aultmann y Moghaddam (2001) para llevarlo a cabo en una versión acuática. Esta adaptación permite evaluar la memoria de trabajo sin necesidad de privar a los animales de alimento para motivarles. Ya se ha realizado previamente esta misma modificación en el laberinto radial para evaluar la memoria de trabajo (Bimonte *et al.*, 2000). Recientemente nuestro modelo de laberinto en T acuático ha sido evaluado y validado mediante drogas psicoactivas que modulan la memoria de trabajo (Locchi *et al.*, 2007).

Para realizar esta evaluación conductual se empleó un laberinto en forma de T de Plexiglás (1cm de grosor) de color gris que consta de un brazo largo o principal y un brazo corto perpendicular al principal. El brazo largo está conectado con el brazo corto por dos compuertas correderas (a modo de guillotina) que se manejan manualmente y que dividen al brazo corto en dos extremos, derecho (D) e izquierdo (I) (ver Figura 16). Las medidas son 100x20x40cm para el brazo largo y 90x20x40 para el brazo corto. En cada extremo del brazo corto se encuentra una plataforma gris de Plexiglás (10x10cm), que puede retirarse y que cuelga mediante un soporte del borde superior del laberinto y permanece 1cm por

debajo del nivel del agua. La temperatura del agua se mantuvo constante a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. El estudio se llevó a cabo en la fase oscura del ciclo luz/oscuridad (luz roja), por lo que los animales no disponían de pistas visuales que pudiesen ayudarles en la realización de la prueba.

La memoria de trabajo se evaluó mediante una prueba de alternancia con ensayos pareados discretos, imponiendo como regla de aprendizaje la falta de correspondencia retardada a una muestra (*delayed non-matching to sample*) (Figura 16). De forma resumida, la prueba consiste en la realización diaria, por parte de los animales, de una secuencia de 10 ensayos pareados independientes, que consisten en una Carrera Forzada seguida de una Carrera Libre con un intervalo de retención entre ambas. En la Carrera Forzada se obliga al animal a nadar hacia uno de los extremos del brazo corto donde encontrará la plataforma (la entrada al otro extremo se encontrará bloqueada gracias a la compuerta correspondiente). Transcurrido el intervalo de retención (*delay*) se coloca de nuevo al animal en el laberinto para que realice la Carrera Libre, habiendo retirado previamente la plataforma del extremo al cual se había dirigido en la Carrera Forzada. En la Carrera Libre el animal puede elegir hacia qué extremo del brazo corto puede dirigirse ya que ambos se encuentran abiertos, pero sólo hallará la plataforma en el extremo opuesto al que se dirigió en la Carrera Forzada. El tiempo entre ensayos pareados se denomina Intervalo entre ensayos. Tanto durante el Intervalo de retención como durante el Intervalo entre ensayos la rata permaneció en una caja de Plexiglás en la misma habitación donde se realizó la prueba.

5.2.Procedimiento experimental.

El primer día cada animal es forzado a nadar durante 1 minuto en el laberinto, teniendo acceso libre a los extremos del brazo corto, en los cuales no hay plataformas colocadas, de modo que el animal pueda explorar todo el laberinto y habituarse al mismo.

El segundo y tercer día los animales realizan 10 ensayos pareados independientes pero en los que el animal sólo realiza Carreras Libres (siempre hay uno de los dos extremos del brazo corto que se encuentra bloqueado con el fin de facilitar el aprendizaje). Durante estos dos días, en cada ensayo pareado se actúa del siguiente modo: el animal es depositado en el agua en el extremo de salida del brazo largo del laberinto con acceso a un solo extremo del brazo corto (I o D) donde permanece 10s. A continuación se recoge al animal y se le

deposita durante 10s (Intervalo de retención) en una jaula provisional para, seguidamente, volver a colocarlo en el extremo de salida del brazo largo con acceso únicamente al extremo contrario al que ha visitado anteriormente y en el que también encontrará una plataforma. Seguidamente el animal es devuelto a la jaula provisional donde permanece durante 30s (Intervalo entre ensayos) hasta el siguiente ensayo pareado.

A partir del cuarto día comienzan los ensayos pareados que consisten en una Carrera Forzada y una Carrera Libre. Se procede del mismo modo que en los días anteriores pero en este caso en la segunda parte de cada ensayo el animal tiene acceso libre a ambos extremos del brazo corto y sólo hallará plataforma en el extremo opuesto al que se dirigió en la Carrera Forzada. Si el animal elige el extremo erróneo en la Carrera Libre se bajan las compuertas y es encerrado durante 10s en el extremo del brazo corto al que ha llegado y, transcurrido ese tiempo, se levantan ambas compuertas para dar acceso al animal al brazo en el que se encontraba colocada la plataforma. Estos ensayos pareados se repiten 10 veces al día utilizando una secuencia aleatoria (ej: D-I-D-D-I-I-D-D-I-I). La misma secuencia se mantuvo para todos los animales en el mismo día pero fue diferente cada día. Los animales fueron entrenados hasta alcanzar el criterio de aprendizaje, que consistió en alcanzar una tasa de aciertos igual o superior al 70% (7 aciertos de 10 posibles) durante, al menos, tres días consecutivos.

Cuando los animales alcanzaron el criterio de aprendizaje, se evaluó la memoria de trabajo en condiciones de estrés agudo, para lo cual, previamente a la realización de la prueba en el laberinto en forma de T se introdujo al animal en un campo abierto iluminado con una luz blanca (60W) durante 10min. El campo abierto fue el mismo que el descrito previamente (ver punto 4) El día siguiente se evaluó la memoria de trabajo del animal del mismo modo que durante los días de entrenamiento, para comprobar que los efectos del estrés no se prolongaron en el tiempo más allá de un día.

Por último, se evaluó a los animales imponiéndoles un mayor intervalo de retención, que pasó de 10 a 100s en todos los ensayos durante 3 días consecutivos, con el fin de comprobar que la prueba era dependiente de dicho intervalo de retención y, por tanto, de memoria de trabajo.

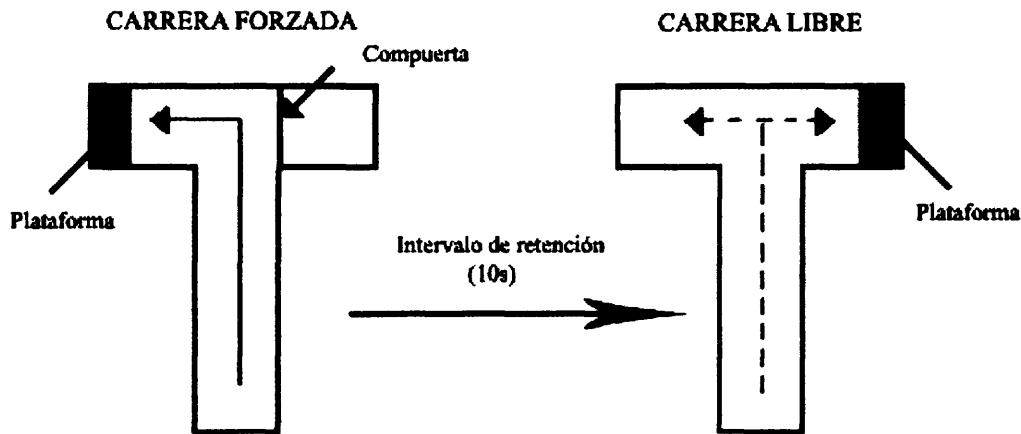


Figura 16. Ejemplo de ensayo pareado en el laberinto en T. El animal, en la carrera forzada, es obligado a dirigirse al extremo izquierdo del brazo corto del laberinto en T. Transcurrido el intervalo de retención (10s en una caja), el animal es de nuevo colocado en el laberinto para realizar la carrera libre, donde sólo encontrará la plataforma en el extremo del brazo corto contrario al que se dirigió en la carrera forzada (en el ejemplo de la figura, el extremo derecho).

6. Protocolo experimental.

En la Tabla 7 puede observarse de forma esquematizada el protocolo experimental empleado con cada animal en el caso de los experimentos correspondientes a los objetivos 1 y 2.

Condición ambiental	Conducta	Cirugía	Recuperación	Microdiálisis	Sacrificio
3, 12 ó 21 meses	1 mes		6-7 días		

Tabla 7. Protocolo experimental empleado para el desarrollo de los objetivos 1 y 2.

En la Tabla 8 puede observarse de forma esquematizada el protocolo experimental empleado con cada animal en el caso de los experimentos correspondientes a los objetivos 3.2 y 3.3.

Condición ambiental	Cirugía	Recuperación	Microdiálisis	Sacrificio
3 meses		6-7 días		

Tabla 8. Protocolo experimental empleado para el desarrollo de los objetivos 3.2 y 3.3.

Es importante mencionar en este caso de que los animales empleados en el objetivo 3.3 se mantuvieron en condiciones estándar y no se les mantuvo durante 3 meses en esas

condiciones, sino que fueron utilizados a su llegada, tras una semana de habituación.. Una parte de estos animales se empleó para evaluar la CORT en plasma (los animales no fueron operados) y otra parte se empleó para evaluar la CORT libre en el cerebro, por lo que estos animales sí fueron operados. Con respecto a los animales empleados en el objetivo 3.1., éstos fueron sacrificados una vez que habían sido mantenidos durante 3 meses en su condición ambiental correspondiente.

7. Análisis estadístico.

Para analizar los resultados de los experimentos de microdiálisis correspondientes a los diferentes neurotransmisores y la CORT, se emplearon análisis de varianza (ANOVA) factoriales de 3 vías con medidas repetidas, siendo los factores Grupo (Niveles: EA y Control), Edad (Niveles: 6, 15 y 24/27 meses) y Tiempo (Niveles: cada una de las muestras obtenidas durante el desarrollo de los experimentos de microdiálisis), seguidos de comparaciones planeadas (análisis *a priori*). Con el fin de comparar los incrementos producidos por el estrés sobre las distintas sustancias químicas evaluadas (neurotransmisores y CORT), los datos se analizaron como el promedio de los incrementos absolutos (4 muestras, recogidas desde los 80 hasta los 140 min) con respecto a los niveles basales (3 muestras).

Los resultados de las concentraciones basales de los distintos neurotransmisores y de la CORT se analizaron mediante ANOVA de dos vías (Grupo x Edad), seguidos de comparaciones planeadas.

Los resultados de la actividad motora se analizaron mediante ANOVA de 3 vías con medidas repetidas, siendo los factores Tratamiento (Niveles: EA y aislamiento), Edad (Niveles: 6, 15 y 24 meses) y Tiempo (Niveles: fracciones de 5min durante 1h) y seguidos de comparaciones planeadas. Los niveles plasmáticos basales de CORT de los experimentos correspondientes al objetivo 3.3 se calcularon mediante comparaciones de medias (t de Student).

Los resultados del efecto del estrés sobre la realización del laberinto acuático en forma de T se evaluaron mediante ANOVA de 3 vías con medidas repetidas, siendo los factores Tratamiento (Niveles: EA y aislamiento), Edad (Niveles: 6, 15 y 24 meses) y

Tiempo (Niveles: media de los 3 días previos al estrés y el día de estrés). Los resultados del intervalo de retención de 10 y 100s se analizaron mediante un ANOVA de 2 vías (Grupo x Edad) donde los datos analizados correspondieron a la media del porcentaje de aciertos de 3 días consecutivos realizando la tarea con los respectivos intervalos de retención. El número de días de aprendizaje se analizó mediante ANOVA de 2 vías (Grupo x Edad) tomando como días de aprendizaje el número de días en alcanzar el criterio de aprendizaje para cada animal.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software Statistica 9.0.

RESULTADOS

1.Efectos del envejecimiento y el EA sobre la liberación de neurotransmisores en la CPF.

1.1.Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración extracelular de dopamina en la CPF de la rata despierta.

1.1.1 Concentración extracelular basal de dopamina.

En la Tabla 1 se muestran las concentraciones extracelulares basales de dopamina en la CPF para cada uno de los grupos experimentales

El ANOVA de dos vías (Edad x Grupo) mostró que del envejecimiento (factor Edad: $F_{2,44}=0.24$; n.s.) o el EA (factor Grupo $F_{1,44}=1.19$; n.s.) no modificaron significativamente la concentración extracelular basal de dopamina en la CPF. La interacción entre ambos factores tampoco fue significativa (Grupo x Edad: $F_{2,44}=0.57$; n.s.).

	6 meses (n=8-9)	15 meses (n=6-8)	24 meses (n=9)
Control	0.71 ± 0.09	0.85 ± 0.19	0.62 ± 0.13
EA	0.66 ± 0.10	0.55 ± 0.13	0.61 ± 0.13

Tabla 1. Concentración extracelular basal de dopamina en la CPF de animales de 6, 15 y 24 meses mantenidos en condiciones control o de EA. Los datos (media \pm EEM) se muestran como concentración absoluta (nM).

1.1.2. Concentración extracelular de dopamina en respuesta a estrés agudo.

Los perfiles temporales del efecto del estrés sobre la concentración extracelular de dopamina en la CPF se muestran en la Figura 1.

El ANOVA de tres vías (Grupo x Edad x Tiempo) mostró que el estrés modificó de forma significativa la concentración extracelular de dopamina en la CPF (factor Tiempo $F_{6,264}=27.00$; $p=0.000$). Además, tanto el envejecimiento como el EA modificaron la concentración extracelular de dopamina producida por estrés en la CPF (factor Edad $F_{2,44}=5.12$; $p=0.026$; factor Grupo $F_{1,44}=5.12$; $p=0.029$). El EA no modificó los efectos del envejecimiento sobre la concentración extracelular de dopamina producida por estrés (Grupo x Edad: $F_{2,44}=0.43$; n.s.).

Las comparaciones planeadas para el promedio de las concentraciones de dopamina de las muestras tomadas en los minutos 80 a 140 del perfil temporal mostraron los efectos que se describen a continuación:

El estrés incrementó de forma significativa la concentración de dopamina en los animales de todos los grupos de edad mantenidos en condiciones control (6 meses: $F_{1,44}=26.10$; $p=0.000$; 15 meses: $F_{1,44}=28.19$; $p=0.000$; 24 meses: $F_{1,44}=7.08$; $p=0.011$) y en los de 6 y 15 meses del grupo de EA (6 meses: $F_{1,44}=9.47$; $p=0.003$; 15 meses: $F_{1,44}=7.72$; $p=0.008$; 24 meses: $F_{1,44}=1.95$; n.s.) (Figura 1). Con respecto al envejecimiento, las comparaciones planeadas mostraron que los incrementos de dopamina producidos por estrés fueron significativamente menores en los animales de 24 meses del grupo Control en comparación con los animales de 15 meses de ese mismo grupo ($F_{1,44}=4.15$; $p=0.048$) y hubo una tendencia no significativa a ser menores al compararlos con los animales de 6 meses del mismo grupo ($F_{1,44}=3.58$; $p=0.065$) (Figura 2). Con respecto a los efectos del EA, las comparaciones planeadas mostraron que si bien al comparar a los animales mantenidos en condiciones control frente a los mantenidos en EA analizando cada una de las edades por separado no hubo diferencias en los incrementos de dopamina producidos por estrés en la CPF, sí que se observó que estos incrementos fueron menores en promedio en los animales mantenidos en condiciones de EA al analizar los tres grupos de edad conjuntamente ($F_{1,44}=5.40$; $p=0.025$) (Figura 2).

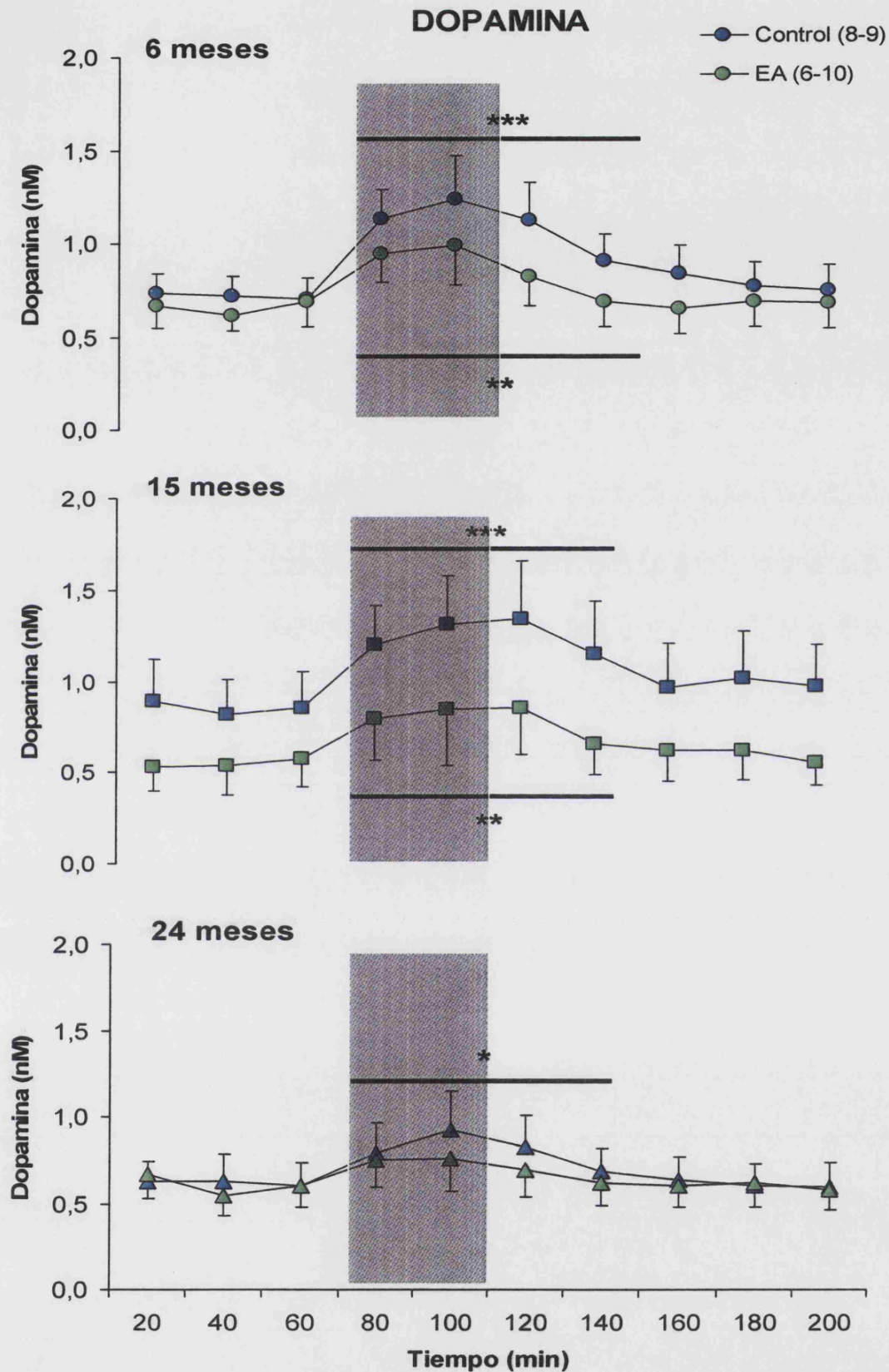


Figura 1. Efecto del estrés (40 min., zona sombreada) sobre la concentración extracelular de dopamina en la CPF de animales de 6, 15 y 24 meses de edad mantenidos en condiciones control o de EA. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) se representan como concentraciones absolutas (nM). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ con respecto a los niveles basales (promedio de las concentraciones de las muestras de 20 a 60min).

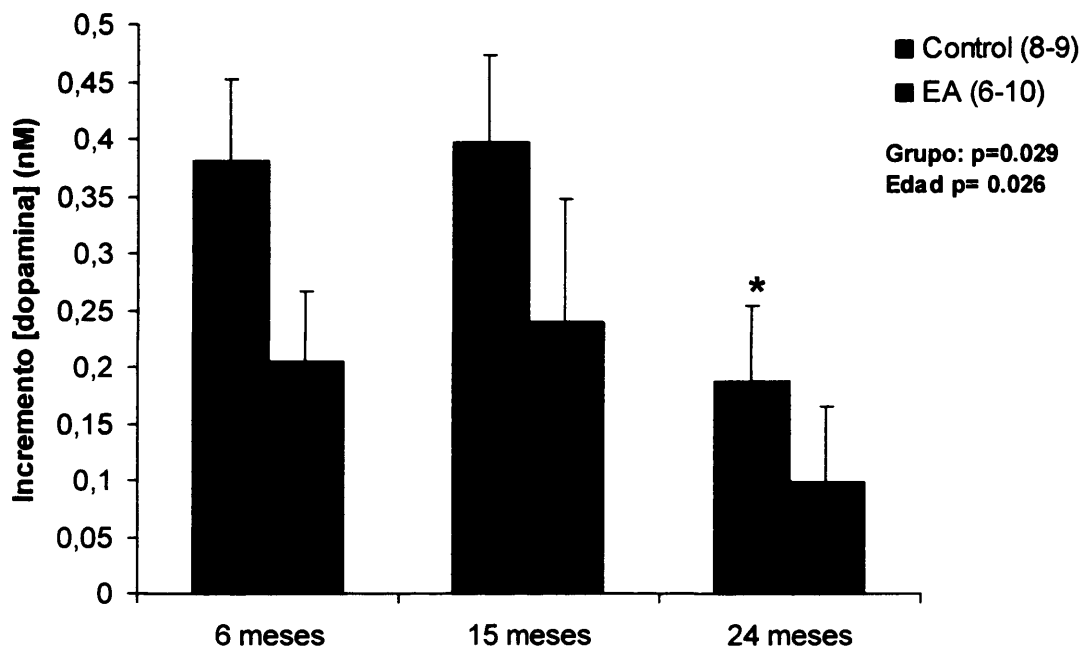


Figura 2. Incrementos de dopamina con respecto a los niveles basales (promedio de los 3 perfundidos previos) producidos por estrés en ambos grupos experimentales y para los tres grupos de edad. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media \pm EEM) representan el promedio del incremento de la concentración de las muestras tomadas de 80 a 140min en el perfil temporal con respecto a los niveles basales (20 a 60min en el perfil temporal). * $p<0.05$ frente a animales de 15 meses.

1.2.Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración extracelular de acetilcolina en la CPF de la rata despierta.

1.2.1.Concentración extracelular basal de acetilcolina.

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones extracelulares basales de acetilcolina en la CPF para cada uno de los grupos experimentales

El ANOVA de dos vías (Edad x Grupo) mostró que el envejecimiento modificó significativamente la concentración basal de acetilcolina en la CPF (factor Edad: $F_{2,48}=6.87$; $p=0.002$), pero el EA no modificó significativamente este parámetro (factor Grupo: $F_{1,48}=3.04$; n.s.). El EA no modificó los efectos del envejecimiento sobre la concentración extracelular basal de acetilcolina (Edad x Grupo: $F_{2,48}=0.42$; n.s.). Las comparaciones planeadas mostraron que la concentración basal de acetilcolina fue menor en los animales de 24 meses que en los de 15 meses del grupo Control ($F_{1,48}=4.31$; $p=0.043$). Los animales mantenidos en condiciones de EA de 24 meses mostraron menores niveles basales de acetilcolina que los animales de 6 ($F_{1,48}=7.58$; $p=0.008$) y 15 meses ($F_{1,48}=8.27$; $p=0.006$) mantenidos en esas mismas condiciones.

	6 meses (n=10-11)	15 meses (n=8-9)	24 meses (n=8-9)
Control	38.68 ± 4.48	46.51 ± 5.24	29.45 ± 5.27*
EA	35.81 ± 2.99	38.12 ± 8.15	17.92 ± 2.03*

Tabla 2. Concentración extracelular basal de acetilcolina en la CPF de animales de 6, 15 y 24 meses mantenidos en condiciones control o de EA. Los datos (media±EEM) se muestran como concentración absoluta (nM), * $p<0.05$, comparado con animales de 15 meses (grupo Control) o con animales de 6 y 15 meses (grupo EA).

1.2.2. Concentración extracelular de acetilcolina en respuesta a estrés agudo.

Los perfiles temporales del efecto del estrés sobre la concentración de acetilcolina en la CPF se muestran en la Figura 3.

El ANOVA de tres vías (Grupo x Edad x Tiempo) mostró que el estrés modificó de forma significativa la concentración extracelular de acetilcolina en la CPF (factor Tiempo: $F_{6,288}=7.40$; $p=0.000$). El EA, pero no el envejecimiento, modificó la concentración extracelular de acetilcolina producida por estrés (factor Grupo: $F_{1,48}=16.55$; $p=0.000$; factor Edad: $F_{2,48}=2.12$; n.s.). La interacción Grupo x Edad no fue significativa ($F_{2,48}=1.50$; n.s.).

Las comparaciones planeadas para el promedio de las concentraciones de acetilcolina de las muestras tomadas en los minutos 80 a 140 del perfil temporal mostraron los efectos que se describen a continuación:

El estrés incrementó de forma significativa la concentración extracelular de acetilcolina en todos los grupos de edad de los animales mantenidos en condiciones control (6 meses: $F_{1,48}=29.53$; $p=0.000$; 15 meses: $F_{1,48}=26.41$; $p=0.000$; 24 meses: $F_{1,48}=23.50$; $p=0.000$) y de los animales de 6 y 24 meses mantenidos en condiciones de EA (6 meses: $F_{1,48}=10.24$; $p=0.002$; 15 meses: $F_{1,48}=0.49$; n.s.; 24 meses: $F_{1,48}=4.46$; $p=0.040$) (Figura 3). Con respecto a los efectos del EA, las comparaciones planeadas mostraron, como puede observarse en la Figura 4, que el incremento de acetilcolina producido por estrés en la CPF fue significativamente menor tanto en los animales de 15 como de 24 meses mantenidos en condiciones de EA, frente a aquellos mantenidos en condiciones control (15 meses: $F_{1,48}=9.86$; $p=0.003$; 24 meses: $F_{1,48}=4.32$; $p=0.043$).

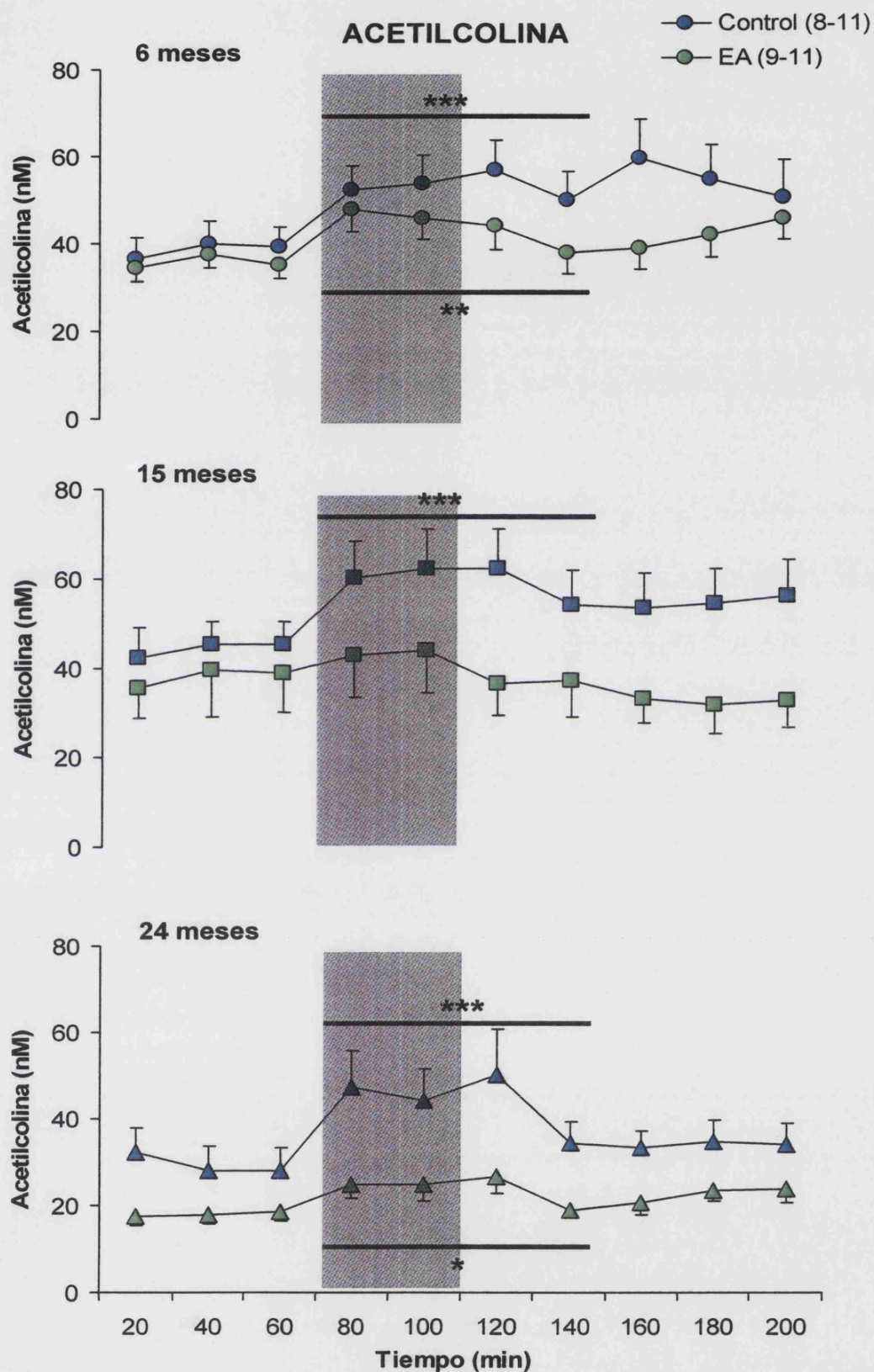


Figura 3. Efecto del estrés (40 min., zona sombreada) sobre la concentración extracelular de acetilcolina en la CPF de animales de 6, 15 y 24 meses de edad mantenidos en condiciones control o de EA. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) se representan como concentraciones absolutas (nM). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ con respecto a los niveles basales (promedio de las concentraciones de las muestras tomadas de 20 a 60min).

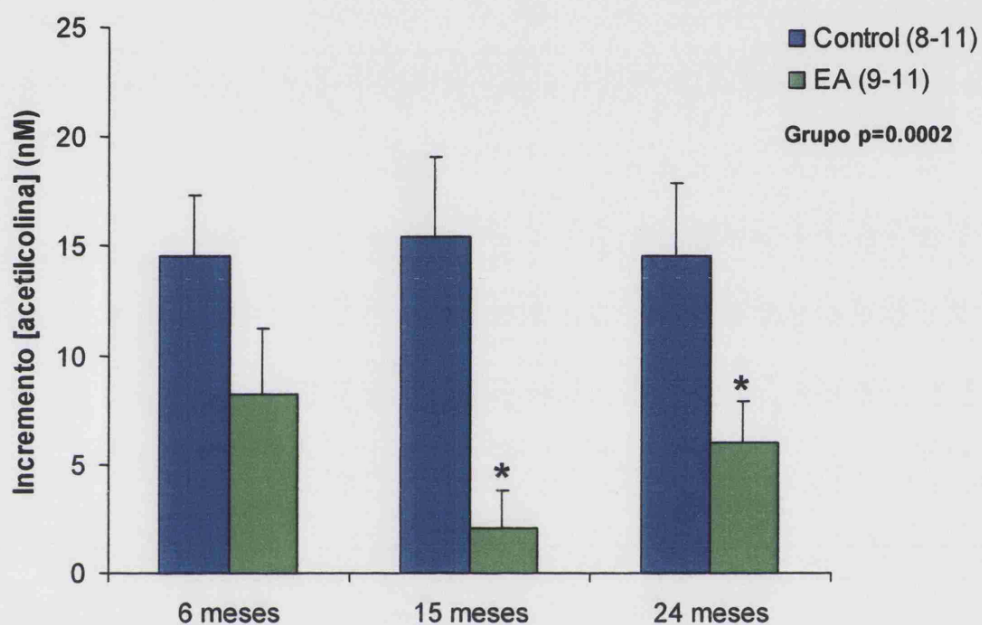


Figura 4. Incrementos de acetilcolina en la CPF producidos por estrés en ambos grupos experimentales y para los tres grupos de edad. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) representan el promedio del incremento de la concentración de las muestras tomadas de 80 a 140min en el perfil temporal con respecto a los niveles basales (20 a 60min en el perfil temporal). * $p < 0.05$ comparado con grupo Control de la misma edad.

1.3.Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración extracelular de glutamato en la CPF de la rata despierta.

1.3.1Concentración extracelular basal de glutamato.

En las Tabla 3 se muestran las concentraciones extracelulares basales de glutamato en la CPF para cada uno de los grupos experimentales.

El ANOVA de dos vías (Edad x Grupo) no mostró efectos significativos ni del envejecimiento (factor Edad: $F_{2,39}=1.14$; n.s.) ni del EA ($F_{1,39}=0.30$; n.s.) sobre su la concentración extracelular basal de glutamato en la CPF. El EA no modificó los efectos del envejecimiento sobre la concentración extracelular basal de glutamato (Grupo x Edad: $F_{2,39}=0.31$; n.s.).

	6 meses (n=8)	15 meses (n=5-7)	24 meses (n=8)
Control	0.91 ± 0.16	1.21 ± 0.25	0.86 ± 0.13
EA	1.16 ± 0.25	1.15 ± 0.21	0.92 ± 0.12

Tabla 3. Concentración extracelular basal de glutamato en la CPF de animales de 6, 15 y 24 meses de edad mantenidos en condiciones control o de EA. Los datos (media \pm EEM) se muestran como concentración absoluta (μ M).

1.3.2. Concentración extracelular de glutamato en respuesta a estrés agudo.

Los perfiles temporales del efecto del estrés sobre la concentración extracelular de glutamato en la CPF se muestran en las Figura 5.

El ANOVA de tres vías (Grupo x Edad x Tiempo) mostró que el estrés no modificó significativamente la concentración extracelular de glutamato en la CPF (factor Tiempo: $F_{6,216}=2.03$; n.s.). Además, ni el envejecimiento (factor Edad: $F_{2,36}=1.00$; n.s.) ni el EA (factor Grupo: $F_{1,36}=1.25$; n.s.) modificaron las concentraciones extracelulares de glutamato en respuesta a estrés. El EA tampoco modificó los efectos del envejecimiento sobre la concentración extracelular de glutamato (Grupo x Edad: $F_{2,36}=0.08$; n.s.).

Las comparaciones planeadas para el promedio de las concentraciones de las muestras tomadas entre los minutos 80 a 140min perfil temporal no mostraron efectos significativos del estrés sobre la concentración extracelular de glutamato en ninguno de los grupos experimentales.

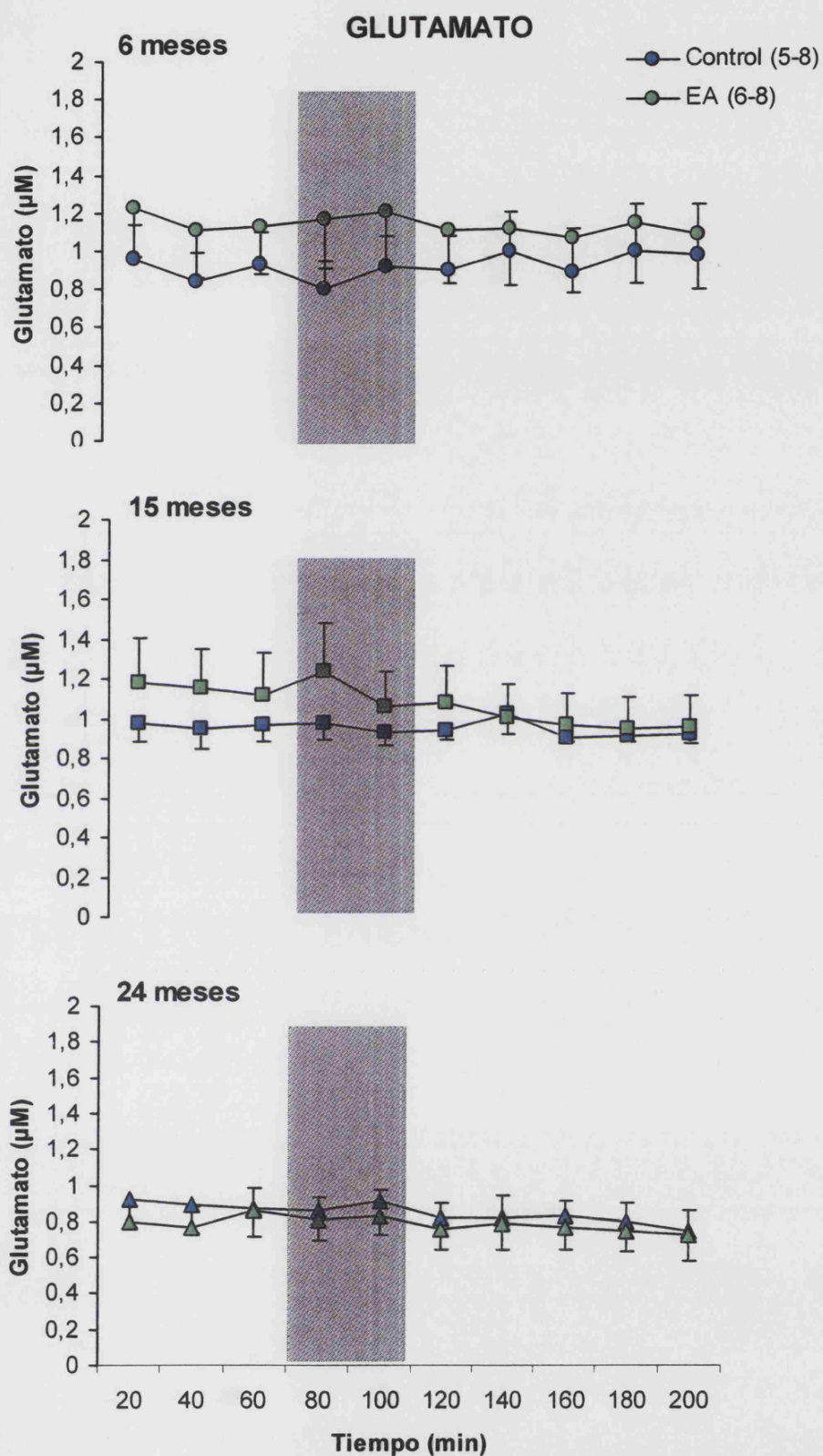


Figura 5. Efecto del estrés (40 min., zona sombreada) sobre la concentración extracelular de glutamato en la CPF de animales de 6, 15 y 24 meses de edad, mantenidos en condiciones control o de EA. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos ($\text{media} \pm \text{EEM}$) se representan como concentraciones absolutas (μM).

2. Efectos del envejecimiento y del EA sobre conductas asociadas a la CPF.

2.1. Efectos del envejecimiento y del EA sobre la actividad motora espontánea.

2.1.1. Actividad motora horizontal.

La Figura 6 muestra el perfil temporal de la actividad motora horizontal para cada uno de los grupos experimentales.

El ANOVA de 3 vías (Grupo x Edad x Tiempo) mostró un efecto significativo del factor Tiempo ($F_{11,935}=63.16$; $p=0.000$). Además, tanto el envejecimiento (factor Edad: $F_{2,85}=33.20$; $p=0.000$) como el EA (factor Grupo: $F_{1,85}=11.15$; $p=0.001$) modificaron de forma significativa la actividad motora horizontal desplegada por los animales durante 60 minutos de exposición a un campo abierto. La interacción Grupo x Edad no alcanzó significación estadística ($F_{2,85}=1.50$; n.s.), pero sí lo hicieron las interacciones Edad x Tiempo ($F_{22,935}=2.76$; $p=0.000$) y Grupo x Tiempo ($F_{11,935}=2.70$; $p=0.002$), lo que indica que la habituación al campo abierto fue diferente en función de la edad y de las condiciones ambientales.

Con respecto a los efectos del EA, las comparaciones planeadas mostraron que los animales de 6 y 15 meses de edad mantenidos en condiciones de EA mostraron menores niveles de actividad motora total que los animales mantenidos en condiciones control de esas mismas edades (6 meses: $F_{1,85}=8.02$; $p=0.006$; 15 meses: $F_{1,85}=6.36$; $p=0.013$) (Figura 7). Con respecto a los efectos del envejecimiento, las comparaciones planeadas mostraron que los animales de 24 meses mantenidos en condiciones control mostraron menores niveles de actividad motora total que los de 6 y 15 meses mantenidos en esas mismas condiciones (6 meses: $F_{1,85}=47.77$; $p=0.000$; 15 meses: $F_{1,85}=13.26$; $p=0.000$). En cuanto a los animales mantenidos en EA, los de 24 meses mostraron una menor actividad motora horizontal total que los de 6 meses mantenidos en sus mismas condiciones ($F_{1,85}=21.17$; $p=0.000$).

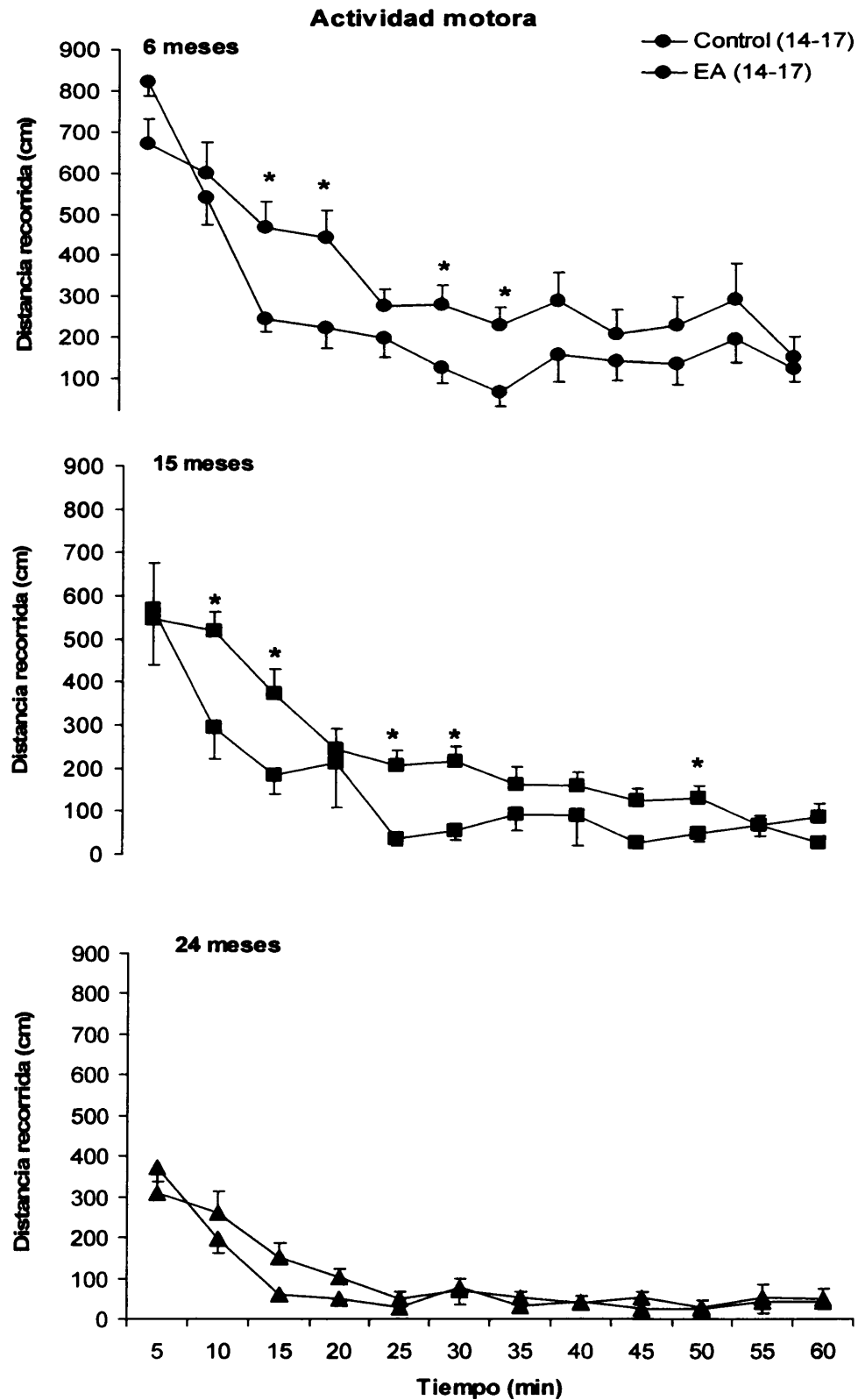


Figura 6. Actividad motora horizontal en un campo abierto desplegada por animales de 6, 15 y 24 meses mantenidos en condiciones control o de EA durante 60min de exposición al mismo. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) se expresan como valores absolutos de distancia (en cm) en fracciones de 5min. * $p < 0.05$ comparado con EA.

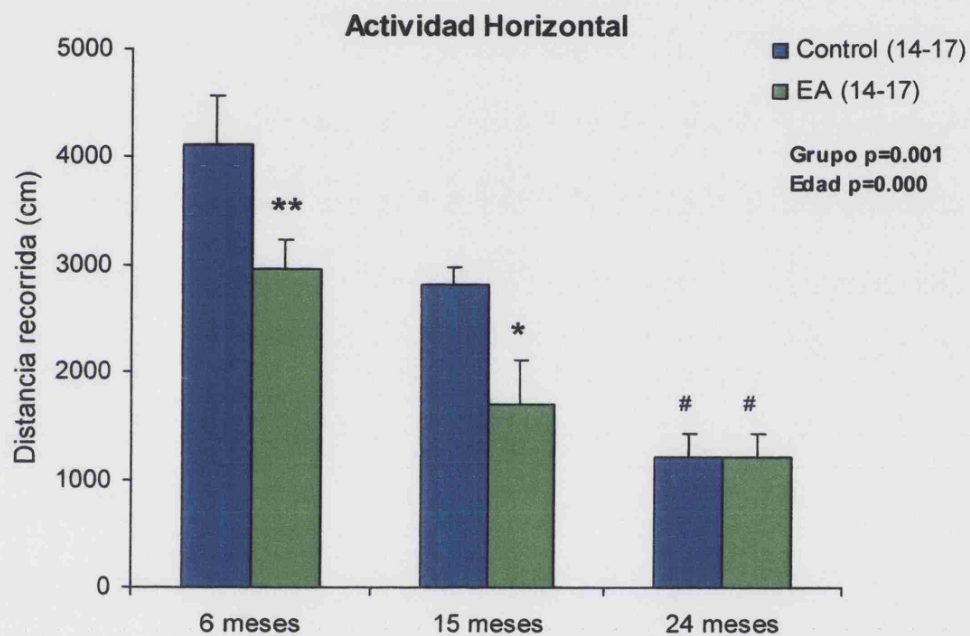


Figura 7. Actividad motora horizontal total desplegada en un campo abierto por los animales de los dos grupos experimentales y para los 3 grupos de edad durante 60min de exposición al mismo. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media \pm EEM) se representan como valores absolutos de distancia (en cm). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ comparado con el grupo Control de la misma edad; # $p<0.001$ comparado con los animales de 6 y 15 meses (grupo Control) o comparado con animales de 6 meses (grupo EA).

2.1.2. Actividad motora vertical.

La Figura 8 muestra el perfil temporal de la actividad motora vertical para cada una de las edades.

El ANOVA de 3 vías (Grupo x Edad x Tiempo) mostró que el factor Tiempo modificó de forma significativa la actividad motora de forma desplegada por los animales durante 60min de exposición a un campo abierto ($F_{11,935}=33.83$; $p=0.000$). Además, tanto el envejecimiento (factor Edad: $F_{2,85}=31.21$; $p=0.000$), como el EA (factor Grupo: $F_{1,85}=9.37$; $p=0.003$) modificaron significativamente este parámetro. La interacción Grupo x Edad no alcanzó significación estadística ($F_{2,85}=0.53$; n.s.), pero sí lo hizo la interacción Edad x Tiempo ($F_{22,935}=4.05$; $p=0.000$), lo que indica que la habituación de la actividad motora fue diferente en función del grupo de edad estudiado.

Las comparaciones planeadas mostraron que los animales de 6 meses mantenidos en condiciones de EA mostraron menores niveles de actividad motora total que los animales mantenidos en condiciones control ($F_{1,85}=6.33$; $p=0.013$) y hubo una tendencia no significativa en los animales de 15 meses ($F_{1,85}=3.62$; $p=0.060$) (Figura 9). Con respecto a los efectos del envejecimiento, las comparaciones planeadas mostraron que los animales de 24 meses mantenidos en condiciones control mostraron menores niveles de actividad motora vertical total que los de 6 y 15 meses mantenidos en esas mismas condiciones (6 meses: $F_{1,85}=38.79$; $p=0.000$; 15 meses: $F_{1,85}=5.20$; $p=0.025$). En los animales mantenidos en condiciones de EA los animales de 24 meses mostraron una menor actividad motora vertical total que los animales de 6 meses mantenidos en las mismas condiciones ($F_{1,85}=22.02$; $p=0.000$).

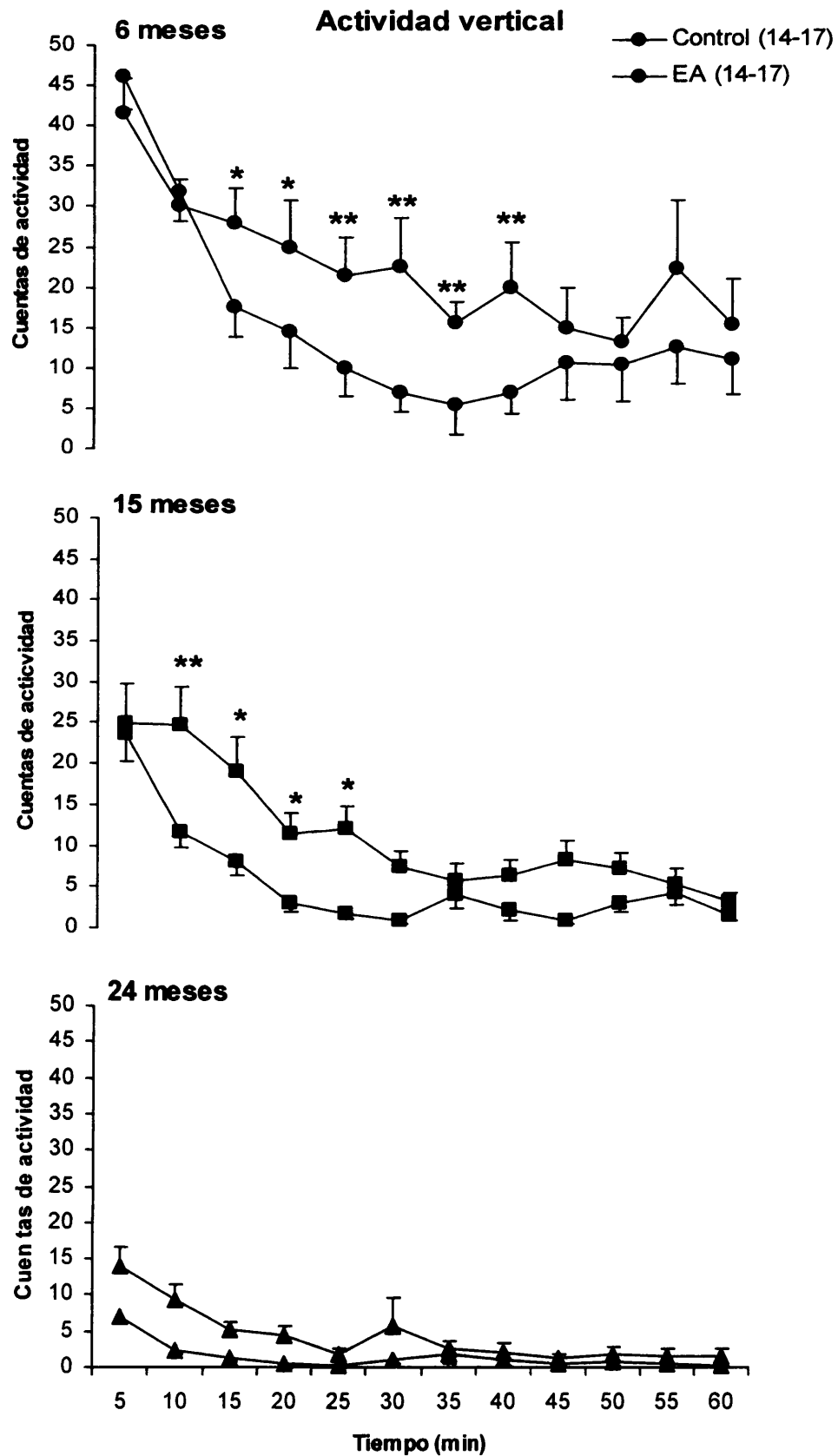


Figura 8. Actividad motora vertical en un campo abierto desplegada por animales de 6, 15 y 24 meses de edad mantenidos en condiciones control o de EA durante 60min de exposición al mismo. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) se expresan como valores absolutos (cuentas de actividad) en fracciones de 5min. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ comparado con EA.

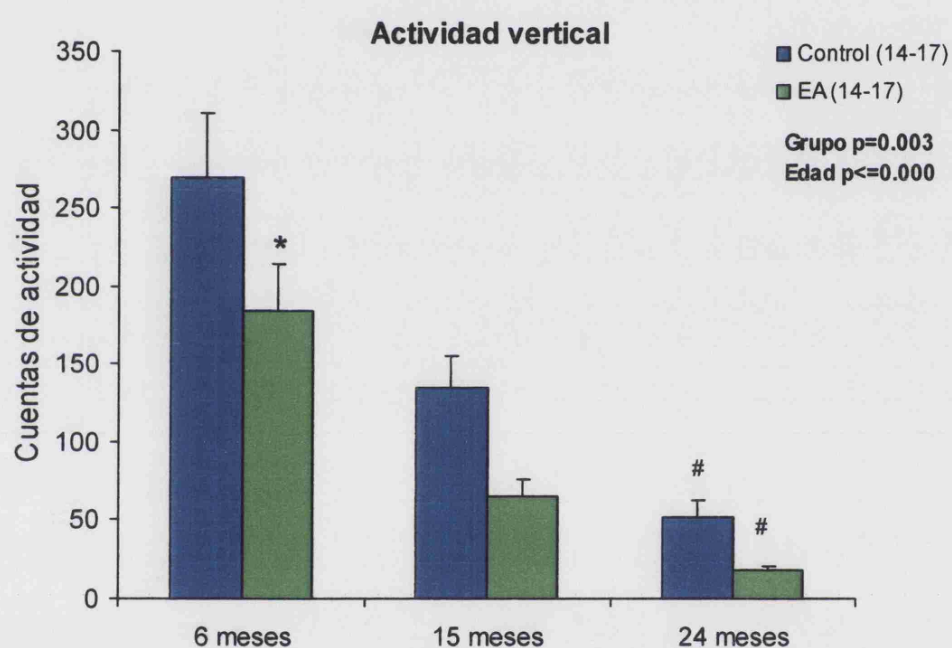


Figura 9. Actividad motora vertical total desplegada por los animales de los dos grupos experimentales y para los tres grupos de edad, 60min de exposición a un campo abierto. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos se representan como media \pm EEM. * $p<0.05$ comparado con el grupo Control; # $p<0.05$ comparado con los animales de 6 y 15 meses del mismo grupo (grupo Control) o comparado con los animales de 6 meses del mismo grupo (grupo EA).

2.2. Efectos del envejecimiento y del EA sobre la memoria de trabajo.

2.2.1. Evaluación de la memoria de trabajo en condiciones basales.

La Tabla 4 muestra el número de días empleado por los animales hasta alcanzar el criterio de aprendizaje en una prueba de alternancia retrasada (laberinto en forma de T acuático). La Figura 10 muestra el perfil temporal del aprendizaje de la tarea así como el efecto del estrés sobre la realización de la misma.

El ANOVA de 2 vías (Grupo x Edad) mostró que el envejecimiento modificó significativamente el número de días de aprendizaje de la prueba de memoria de trabajo (factor Edad: $F_{2,57}=19.85$; $p=0.000$). El EA no modificó el número de días de aprendizaje (factor Grupo: $F_{1,59}=3.26$; n.s.). El EA tampoco modificó el efecto de la edad sobre el aprendizaje (Grupo x Edad: $F_{2,59}=0.85$; n.s.). Las comparaciones planeadas mostraron que los animales de 24 meses necesitaron más días para alcanzar el criterio de aprendizaje que los animales de 6 meses mantenidos tanto en condiciones control ($F_{1,57}=12.54$; $p=0.001$) como de EA ($F_{1,57}=28.26$; $p=0.000$).

La Tabla 5 muestra el porcentaje de aciertos de los animales para intervalos de retención de 10 y 100s.

En el caso del intervalo de retención de 10s, el ANOVA de dos vías (Grupo x Edad) mostró que el envejecimiento, pero no el EA, modificó el porcentaje de aciertos (factor Edad $F_{2,57}=3.77$; $p=0.029$; factor Grupo $F_{1,57}=2.61$; n.s.). El EA no modificó el efecto del envejecimiento sobre el porcentaje de aciertos (Grupo x Edad: $F_{2,57}=0.84$; n.s.). Las comparaciones planeadas mostraron que, con un intervalo de retención de 10s, los animales de 24 meses mantenidos en condiciones de EA mostraron un menor porcentaje de aciertos que los de 6 meses en esas mismas condiciones ($F_{1,57}=4.66$; $p=0.035$).

En el caso del intervalo de retención de 100s, tanto el envejecimiento como el EA modificaron de forma significativa el porcentaje de aciertos (factor Edad: $F_{2,57}=13.80$; $p=0.000$; factor Grupo: $F_{1,57}=6.45$; $p=0.014$). Además el efecto del EA fue diferente en función del grupo experimental (Grupo x Edad ($F_{2,57}=3.85$; $p=0.027$)). Las comparaciones planeadas revelaron que los animales de 24 meses mostraron de forma

significativa un menor porcentaje de aciertos al realizar la prueba que los animales de 6 meses tanto en el caso de aquellos mantenidos en condiciones control ($F_{1,57}=4.15$; $p=0.046$) como de EA ($F_{1,57}=20.51$; $p=0.000$). Además, los animales controles de 24 meses mostraron un mayor porcentaje de aciertos que los mantenidos en EA para un intervalo de retención de 100s ($F_{1,57}=11.24$; $p=0.001$).

Días de aprendizaje		
	Control	EA
6 meses	10.25±0.48	10.69±0.86
15 meses	9.73±1.46	11.10±1.42
24 meses	16.30±1.68*	19.89±1.32**

Tabla 4. Número de días de aprendizaje hasta alcanzar el criterio (70% de aciertos durante 3 días consecutivos) en la realización de una tarea de memoria de trabajo (laberinto acuático en forma de T). Los datos (media±EEM) se expresan como valores absolutos (días). * $p<0.01$; ** $p<0.001$ comparado con los animales de 6 meses.

Intervalo de retención 10s (% de aciertos)		
	Control	EA
6 meses	84.38±2.09	82.05±1.82
15 meses	84.55±2.31	84.25±2.66
24 meses	79.50±2.71	73.61±2.61*
Intervalo de retención 100s (% de aciertos)		
	Control	EA
6 meses	80.83±4.70	76.67±3.06
15 meses	78.48±1.87	80.00±3.82
24 meses	73.21±2.86*	64.00±6.00*[#]

Tabla 5. Número de aciertos en la realización de una prueba de memoria de trabajo (laberinto acuático en forma de T) con intervalos de retención de 10 y 100s, en el que se evaluó a animales de 6, 15 y 24 meses mantenidos en condiciones control o de EA. Los datos (media±EEM) se expresan como el promedio del porcentaje de aciertos durante 3 días consecutivos. * $p<0.05$ comparado con los animales de 6 meses; [#] $p<0.05$ comparado con los animales Control de 24 meses.

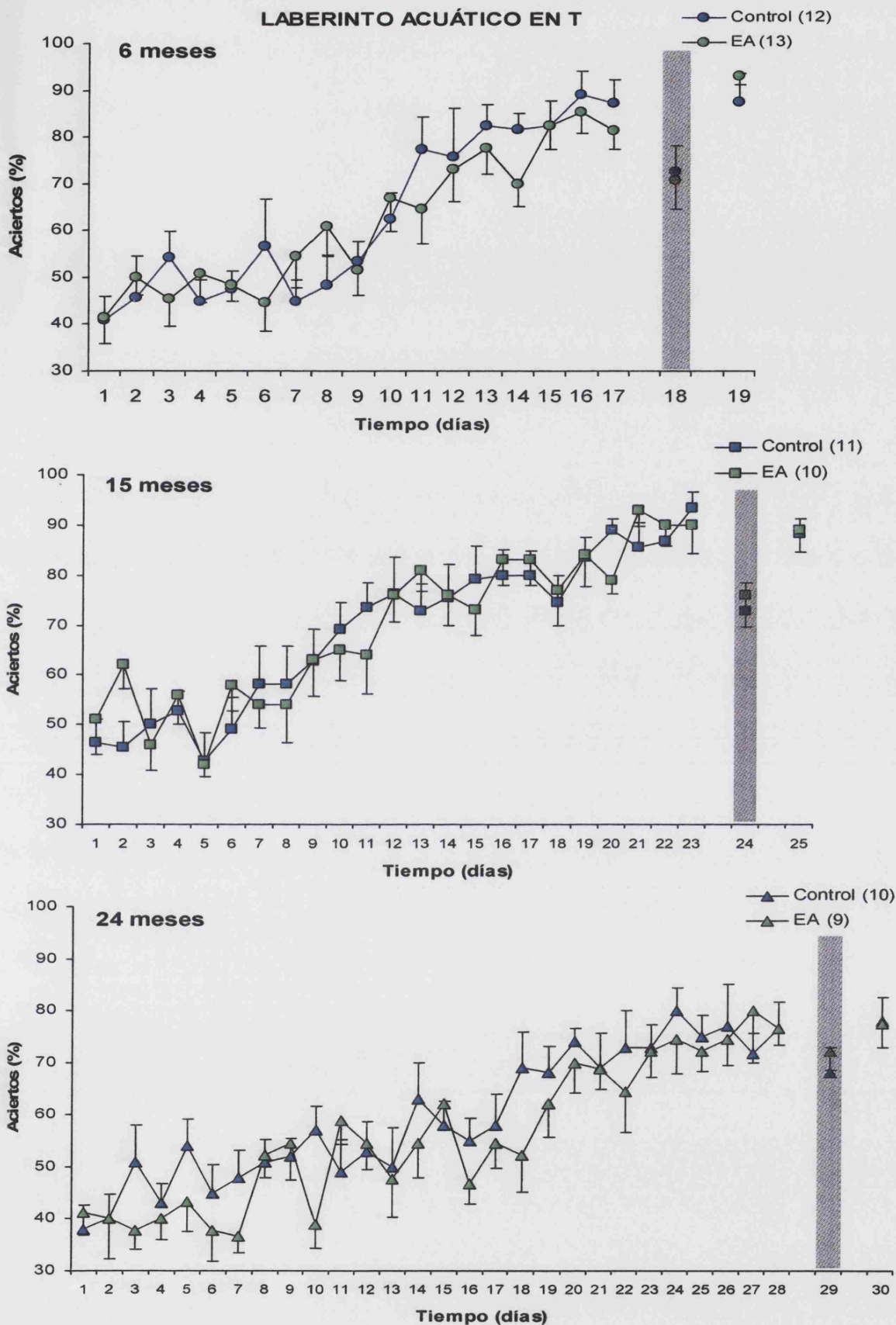


Figura 10. Entrenamiento hasta alcanzar el criterio de aprendizaje en una prueba de alternancia retrasada (laberinto acuático en forma de T). Se muestra además el efecto del estrés agudo (zona sombreada) sobre la realización de la prueba de memoria de trabajo. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) se expresan como porcentajes.

2.2.2. Evaluación de la memoria de trabajo en condiciones de estrés.

Las Figura 11 muestra el efecto del estrés (10min en un campo abierto iluminado) sobre el porcentaje de aciertos de una prueba de memoria de trabajo para cada uno de los grupos experimentales.

El ANOVA de 3 vías (Edad x Grupo x Tiempo) mostró que el estrés modificó de forma significativa el porcentaje de aciertos (factor Tiempo: $F_{1,57}=22.22$; $p=0.000$). Ni el envejecimiento (factor Edad: $F_{2,57}=2.10$; n.s.) ni el EA (factor Grupo: $F_{1,57}=0.07$; n.s.) modificaron de forma significativa el porcentaje de aciertos. El EA no modificó de forma significativa los efectos del envejecimiento sobre la realización de la tarea en condiciones de estrés (Grupo x Edad: $F_{2,57}=0.28$; n.s.).

Las comparaciones planeadas mostraron que el estrés redujo de forma significativa el porcentaje de aciertos en el caso de los animales de 6 y 15 meses en los animales mantenidos en condiciones control (6 meses: $F_{1,57}=7.07$; $p=0.010$; 15 meses: $F_{1,57}=6.83$; $p=0.011$) y en los animales de 6 meses mantenidos en condiciones de EA (6 meses: $F_{1,57}=5.54$; $p=0.022$)(Figura 11). No hubo diferencias significativas en el efecto del estrés al comparar animales mantenidos en condiciones control frente animales mantenidos en condiciones de EA (6 meses: $F_{1,57}=0.082$; n.s.; 15 meses: $F_{1,57}=0.19$; n.s.).

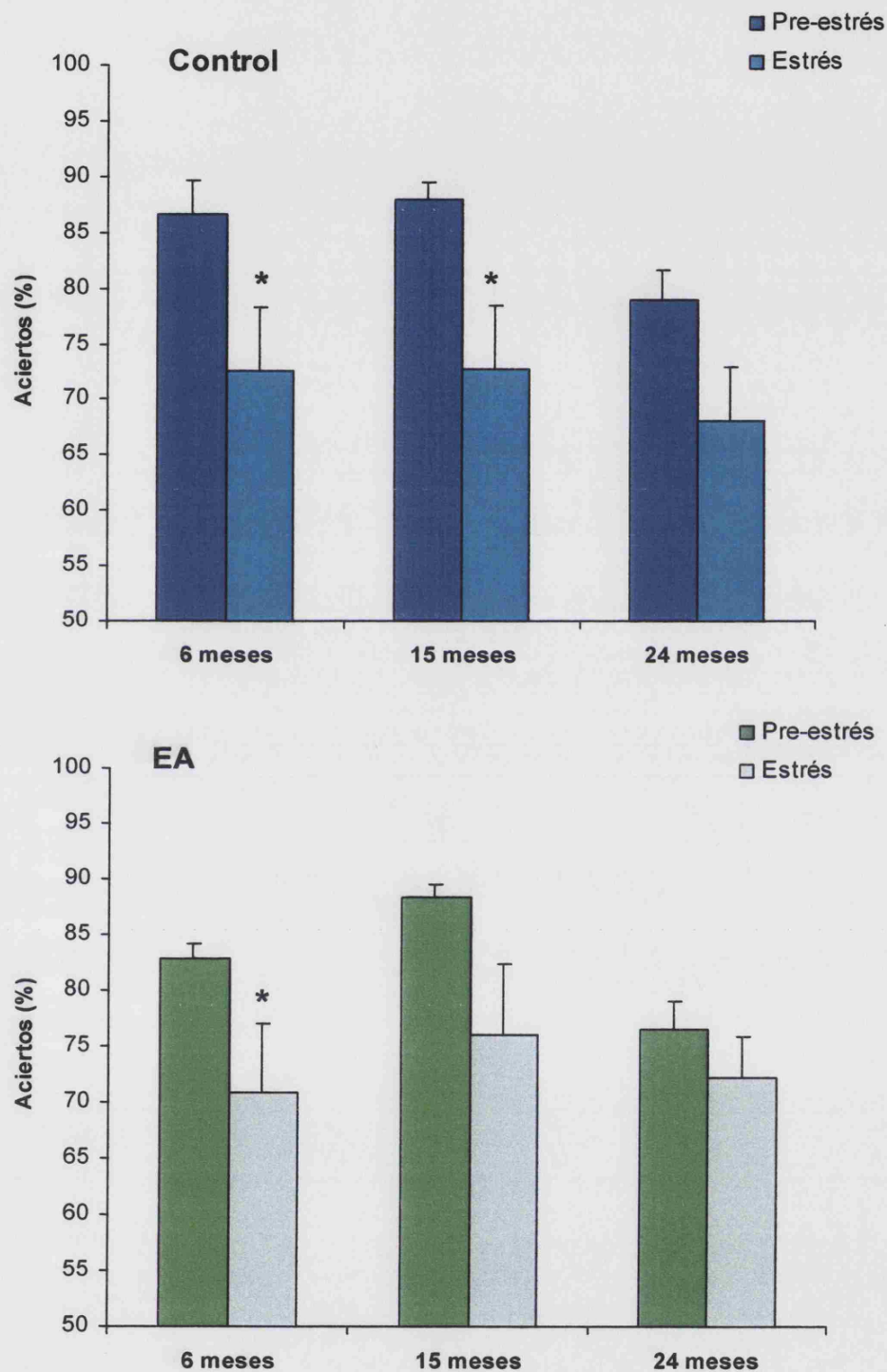


Figura 11. Efecto del estrés agudo (10min en un campo abierto iluminado) sobre el porcentaje de aciertos en animales de 6, 15 y 24 meses mantenidos en condiciones control (arriba) o de EA (abajo). El dato de pre-estrés corresponde al promedio de los 3 días previos de la realización de la prueba en condiciones de estrés. Los datos (media±EEM) se expresan como promedio del porcentaje de aciertos. * $p < 0.05$ comparado con pre-estrés. Control ($n=10-12$), EA ($n=9-13$).

3. Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración de CORT.

3.1. Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración de CORT libre en la CPF de la rata despierta.

Los experimentos de microdialisis correspondientes a esta sección de resultados se llevaron a cabo empleando un protocolo que presentaba algunas diferencias con respecto al empleado en los resultados previos (objetivos 1 y 2). En este caso, el protocolo de estrés consistió en 20min de restricción del movimiento con la ayuda de una tela provista con tiras de velcro (ver Materiales y Métodos, pág. 61). Esta modificación se llevó a cabo debido a que en experimentos preliminares se observó que los incrementos de CORT que se obtenían en respuesta a este estímulo estresante eran más reproducibles y significativos que con el estrés por manipulación (*handling*). En segundo lugar, la edad del grupo de animales viejos en estos experimentos fue de 27 meses.

3.1.1. Concentración extracelular basal de CORT libre.

En la Tabla 6 se muestran los valores basales de CORT en la CPF para cada uno de los grupos experimentales.

El ANOVA de 2 vías (Grupo x Edad) mostró que ni el envejecimiento ($F_{2,74}=0.37$; n.s.) ni el EA modificaron las concentraciones basales de CORT en la CPF, si bien existe una tendencia no significativa en el caso del factor Grupo ($F_{1,74}=3.44$; $p=0.067$). El EA no modificó los efectos de la edad sobre la concentración de CORT en la CPF (Grupo x Edad: $F_{2,74}=0.36$; n.s.).

	6 meses (n=16-17)	15 meses (n=11-12)	24 meses (n=12)
Control	0.58 ± 0.11	0.59 ± 0.05	0.71 ± 0.13
EA	0.38 ± 0.05	0.54 ± 0.08	0.56 ± 0.09

Tabla 6. Concentración extracelular basal de CORT libre en la CPF de animales de 6, 15 y 24 meses mantenidos en condiciones control o de EA. Los datos (media \pm EEM) se muestran como concentración absoluta (ng/ml),

3.1.2. Concentración extracelular de CORT libre en respuesta a estrés agudo.

En la Figura 12 se muestran los perfiles temporales del efecto del estrés agudo (20min de restricción del movimiento) sobre la concentración de CORT libre en la CPF para cada uno de los grupos experimentales.

El ANOVA de 3 vías (Edad x Grupo x Tiempo) mostró que el estrés modificó de forma significativa la concentración extracelular de CORT en la CPF (factor Tiempo: $F_{6,444}=32.39$; $p=0.000$). Ni el envejecimiento (factor Edad: ($F_{2,74}=0.07$; n.s.) ni el EA (factor Grupo $F_{1,74}=0.56$; n.s.) modificaron significativamente la concentración extracelular de CORT libre en la CPF. Los efectos del EA sobre los incrementos de CORT producidos por estrés en la CPF fueron diferentes en función del grupo de edad estudiado (Grupo x Edad: $F_{2,74}=3.14$; $p=0.048$).

Las comparaciones planeadas para el promedio de las concentraciones de CORT de las muestras tomadas en los minutos 80 a 140 en el perfil temporal se describen a continuación:

El estrés incrementó significativamente la concentración de CORT libre en la CPF en los animales de todos los grupos de edad tanto en condiciones de control (6 meses: $F_{1,74}=25.98$; $p=0.000$; 15 meses: $F_{1,74}=18.76$; $p=0.000$; 27 meses: $F_{1,74}=12.59$; $p=0.000$), como de EA, si bien en este grupo, en los animales de 15 meses hubo tendencia que no alcanzó la significación estadística (6 meses: $F_{1,74}=4.48$; $p=0.038$; 15 meses: $F_{1,74}=3.81$; $p=0.054$; 27 meses: $F_{1,74}=11.85$, $p=0.000$)(Figura 13). Con respecto a los efectos del EA, las comparaciones planeadas mostraron que el incremento de CORT libre producido por estrés fue significativamente menor en los animales de 6 meses mantenidos en condiciones de EA ($F_{1,74}=4.12$; $p=0.046$) y hubo un descenso aun cuando no significativo en el caso de los animales de 15 meses ($F_{1,74}=3.17$; $p=0.079$)(Figura 13).

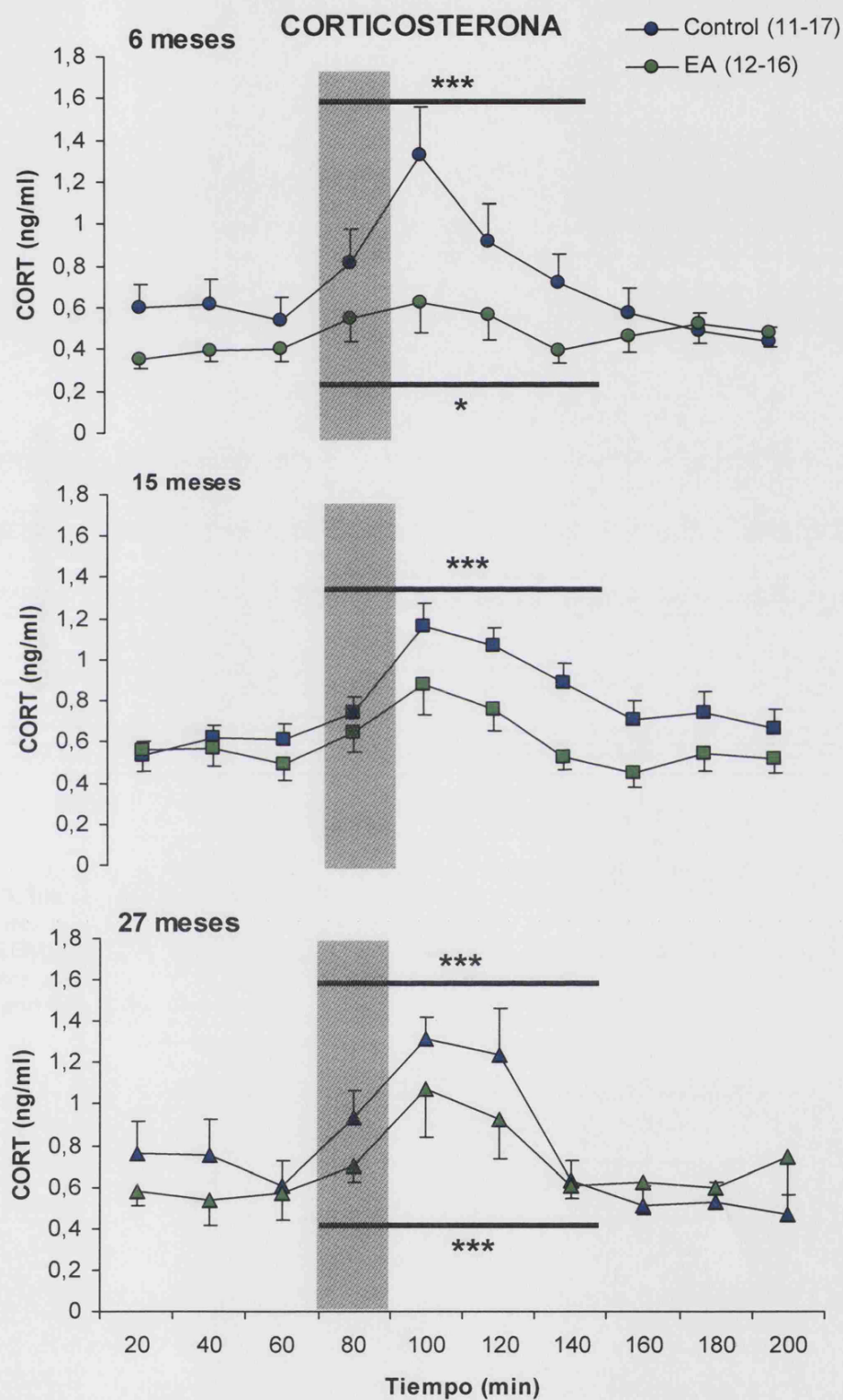


Figura 12. Efecto del estrés (20 min., zona sombreada) sobre la concentración de CORT libre en la CPF de animales de 6, 15 y 27 meses de edad, mantenidos en condiciones control o de EA. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) se representan como concentraciones absolutas (ng/ml). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparado con niveles basales (perfundidos de 20 a 60min).

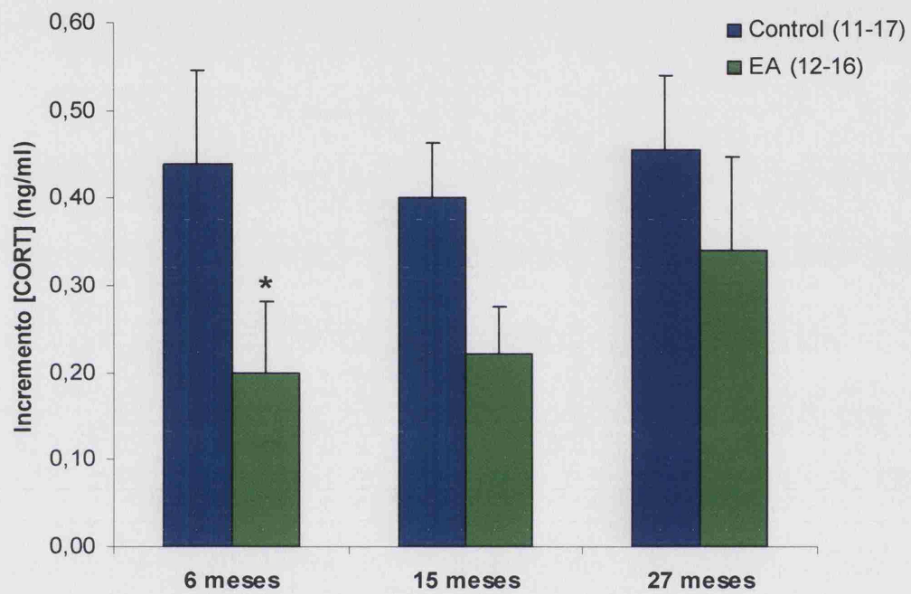


Figura 13. Incremento de CORT libre en la CPF producido por estrés en ambos grupos experimentales y para los tres grupos de edad. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) representan el incremento medio de la concentración de CORT en las muestras tomadas en los minutos 80 al 140 en el perfil temporal frente a los niveles basales (perfundidos de los 20 a los 60min). * $p < 0.05$ comparado con el grupo Control.

3.2.Efectos del envejecimiento y del EA sobre la concentración basal de CORT plasmática.

Los valores correspondientes a la concentración basal de CORT plasmática de cada uno de los grupos experimentales se muestran en la Figura 14.

El ANOVA de dos vías (Grupo x Edad) no mostró efectos significativos ni del envejecimiento (factor Edad: $F_{2,50}=0.16$; n.s.), ni del EA (factor Grupo: $F_{1,50}=0.68$; n.s.), ni de su interacción (Grupo x Edad: $F_{2,50}=1.63$; n.s.) sobre la concentración plasmática basal de CORT. Las muestras de sangre fueron tomadas durante la fase oscura del ciclo luz/oscuridad, lo que podría explicar los altos niveles basales de CORT mostrados por ambos grupos.

Las comparaciones planeadas mostraron que los animales control de 6 meses mostraron una concentración basal de CORT significativamente mayor que la de los animales mantenidos en condiciones de EA de esa misma edad ($F_{1,50}=4.18$; $p=0.046$).

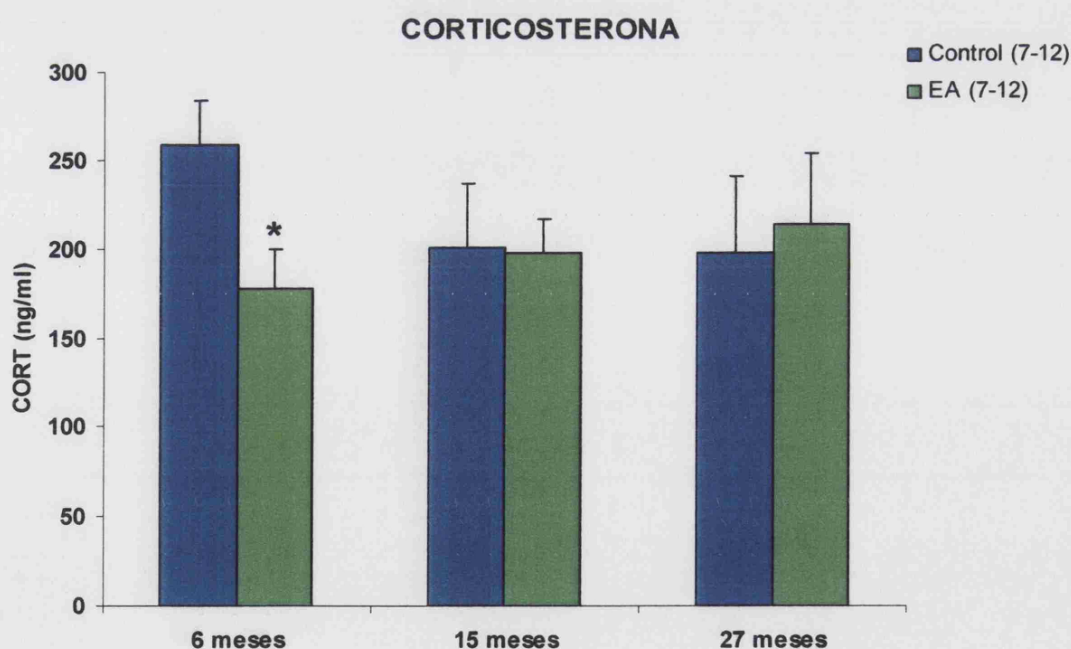


Figura 14. Concentración basal de CORT plasmática de animales de 6, 15 y 27 meses mantenidos en condiciones control o de EA. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) se muestran como valores absolutos (ng/ml). * $p<0.05$ comparado con el grupo Control.

3.3.Efecto del envejecimiento sobre la concentración de CORT plasmática y de CORT libre en el cerebro (hipocampo y CPF).

Es importante señalar que para llevar a cabo estos experimentos se emplearon ratas en condiciones estándar (3-4 animales por jaula, sin objetos) de 6 y 27 meses, que corresponden a los grupos de animales jóvenes y viejos empleados en los experimentos correspondientes a los objetivos 3.1 y 3.2.

3.3.1.Concentraciones basales de CORT plasmática total y CORT libre en el cerebro.

En la Tabla 7 se muestran las concentraciones basales de CORT plasmática total y de CORT libre en el hipocampo y la CPF de los grupos experimentales estudiados.

El análisis de comparación de medias (t de Student) mostró que la concentración basal de CORT plasmática no fue diferente entre ambos grupos de edad ($t_{1,10}=1.15$; n.s.). Las muestras de sangre fueron tomadas durante la fase oscura del ciclo luz/oscuridad, lo que podría explicar los altos niveles basales de CORT plasmática mostrados por ambos grupos.

Los niveles basales de CORT fueron, sin embargo, significativamente mayores en los animales de 27 meses, tanto en el hipocampo ($t_{1,37}=-3.17$; $p=0.003$), como en la CPF ($t_{1,31}=-3.13$; $p=0.004$).

	Plasma (n=6)	Hipocampo (n=9-11)	CPF (n=8-9)
Jóvenes (6 meses)	191.75 ± 28.52	0.36 ± 0.05	0.33±0.03
Viejas (27 meses)	153.34±17.02	0.66±0.09**	0.72±0.11**

Tabla 7. Concentración basal de CORT plasmática y CORT en el hipocampo y la CPF de animales de 6 y 27 meses de edad. Los datos (media ± EEM) se muestran como concentraciones absolutas de CORT (ng/ml). ** $p<0.01$ comparado con el grupo de 6 meses.

3.3.2. Concentraciones de CORT plasmática y de CORT libre en el cerebro en respuesta a estrés.

La Figura 15 muestra el incremento de CORT plasmática en respuesta a estrés en animales de 6 y 27 meses de edad.

El ANOVA de dos vías (Edad x Tiempo) mostró que el estrés modificó la concentración plasmática de CORT (factor Tiempo: $F_{3,30}=28.94$; $p=0.000$) y el envejecimiento modificó la concentración de CORT producida por estrés (factor Edad: $F_{1,10}=6.88$; $p=0.025$). Las concentraciones plasmáticas de CORT en respuesta a estrés fueron diferentes en función de la edad (Grupo x Tiempo: $F_{3,30}=5.56$; $p=0.004$).

Las comparaciones planeadas mostraron que el estrés produjo un incremento significativo de la concentración de CORT plasmática tanto en los animales de 6 meses ($F_{1,10}=7.15$; $p=0.023$) como en los animales de 27 meses ($F_{1,10}=44.18$; $p=0.000$). El incremento medio de los niveles de CORT plasmática en respuesta a estrés fue significativamente mayor en los animales de 27 meses ($F_{1,10}=7.89$; $p=0.018$).

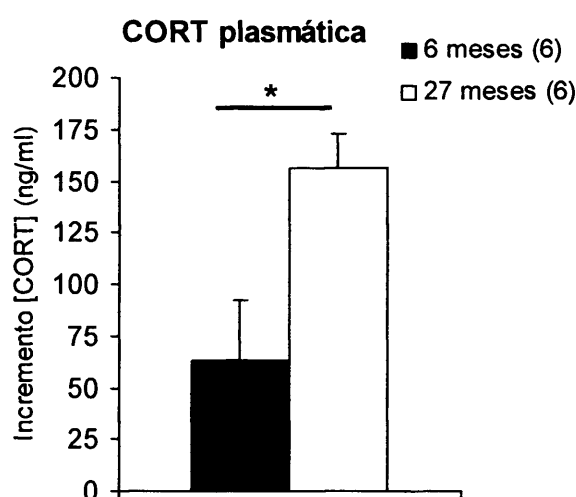


Figura 15. Incremento de CORT plasmática total producido por estrés agudo (20min restricción del movimiento) en animales de 6 y 27 meses de edad. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) se muestran como el promedio de la concentración (en ng/ml) de las muestras tomadas 0 y 60min después del estrés con respecto a los niveles basales tomados inmediatamente antes del estrés.

Los perfiles temporales del efecto del estrés sobre la concentración extracelular de CORT libre en el hipocampo y la CPF se muestran en la Figura 16.

Con respecto al hipocampo, el ANOVA de dos vías (Grupo x Tiempo) mostró un efecto significativo del factor Tiempo ($F_{6,210}=6.72$; $p=0.000$) pero no del grupo ($F_{3,35}=1.72$; n.s.) sobre la concentración de CORT libre en hipocampo. El efecto del factor Tiempo fue diferente en función del grupo estudiado (Edad x Tiempo: $F_{18,210}=2.57$; $p=0.001$).

Las comparaciones planeadas para las concentraciones de las muestras tomadas en los minutos 80 a 140 del perfil temporal mostraron que el estrés incrementó significativamente la concentración extracelular de CORT en el hipocampo tanto en los animales de 6 meses ($F_{1,35}=4.60$; $p=0.039$), como en los de 27 meses ($F_{1,35}=4.15$; $p=0.048$)(Figura 16A). Estos incrementos no fueron diferentes al comparar los animales de 6 y 27 meses ($F_{1,35}=0.41$; n.s.)(Figura 16C)

Con respecto a la CPF, el ANOVA de dos vías (Grupo x Tiempo) mostró un efecto significativo del factor Tiempo ($F_{6,174}=6.71$; $p=0.000$) pero no del factor Grupo ($F_{3,29}=2.09$; n.s.) sobre la concentración de CORT libre en hipocampo. El efecto del factor Tiempo fue diferente en función del grupo estudiado (Grupo x Tiempo: $F_{18,174}=3.20$; $p=0.000$).

Las comparaciones planeadas para las concentraciones de las muestras tomadas en los minutos 80 a 140 del perfil temporal mostraron que el estrés incrementó la concentración extracelular de CORT en la CPF tanto en los animales de 6 meses ($F_{1,29}=7.15$; $p=0.012$), como en los de 27 meses ($F_{1,29}=4.15$; $p=0.048$)(Figura 16B). Estos incrementos no fueron diferentes al comparar a los animales de 6 y 27 meses ($F_{1,29}=0.17$; n.s.)(Figura 16D).

Figura 16. Efecto del estrés sobre la concentración de CORT libre en el hipocampo (A) y la CPF (B) en animales de 6 y 27 meses de edad. Entre paréntesis se muestra el número de animales por grupo. Los datos (media±EEM) se muestran como valores absolutos (ng/ml). Abajo se muestra la comparación del promedio de los incrementos de CORT libre (muestras tomadas en los minutos 80 a 140) con respecto a los niveles basales (muestras tomadas en los minutos 20 a 60) en hipocampo (C) y CPF (D) entre animales de 6 y 27 meses de edad. *p<0.05 y **p<0.01 comparado con Control (no estrés).

DISCUSIÓN

ACERCA DE LOS MÉTODOS.

1. Perfusión cerebral *in vivo*

1.1. Introducción.

Con el fin de estudiar la actividad cerebral tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y, más concretamente, lo referente a la transmisión de moléculas activas (ya sean éstas hormonas o neurotransmisores) se desarrollaron desde los años 60 una serie de técnicas que permitían este tipo de estudios. El método idóneo para lograr este fin debería proporcionar la concentración de sustancias contenidas en el espacio intersticial con una buena resolución temporal y espacial sin alterar el metabolismo o la estructura del tejido analizado (Benveniste *et al.*, 1989).

Cuando se emplea una técnica *in vivo*, la cuantificación de la sustancia o sustancias objeto de estudio se puede realizar directamente en el tejido (*in situ*) o en muestras procedentes del tejido que se analizan fuera del tejido (*ex situ*). Entre las técnicas *in situ* se puede destacar la voltametría y entre las técnicas *ex situ*, son relevantes la copa cortical, el *push-pull* y la microdiálisis (Sharp y Zetterström 2007).

La técnica de voltametría se basa en la implantación de un electrodo en el área cerebral objeto de estudio que permite el análisis, mediante la detección de la oxidación de sustancias electroactivas, de diversas moléculas entre las que se encuentran los neurotransmisores glutamato y dopamina (Westerink y Justice 1991; Baker y Kalivas 2007; Mitala *et al.*, 2008). Las ventajas de esta técnica radican en que la resolución espacial es buena, debido al reducido tamaño de los electrodos (diámetro de entre 1 y 30 μm) y su resolución temporal es del orden de segundos (Baker y Kalivas 2007). A pesar de que el desarrollo de la voltametría tuvo lugar en los años 70 (Kissinger *et al.*, 1973) y de levantar grandes expectativas, su uso no se ha generalizado tanto como el de la microdiálisis. Esto último ha sido debido sobre todo a tres razones: 1) el limitado rango de sustancias que pueden analizarse mediante esta técnica (las moléculas han de ser electroactivas, como las aminas biógenas o el glutamato); 2) los problemas de resolución debidos a la similitud de los potenciales de oxidación de moléculas similares (son casos conocidos los del aspartato con el glutamato, y las catecolaminas con sus

correspondientes metabolitos); 3) la imposibilidad de analizar más de una sustancia al mismo tiempo (Benveniste 1989;Sharp y Zetterström 2007;Chefer *et al.*, 2009). Aún así, la voltametría puede emplearse como técnica complementaria a la microdiálisis, debido sobre todo a su mayor resolución temporal, que permite discriminar sucesos que tienen lugar en el rango de segundos que no podrían ser detectados con la microdiálisis. Un ejemplo de ello se encuentra en el análisis de la dinámica del neurotransmisor acetilcolina (Sarter *et al.*, 2009).

Las técnicas *ex situ* presentan como principal ventaja con respecto a la voltametría la posibilidad de analizar varias sustancias químicas procedentes del espacio intersticial en la misma muestra y evaluar los cambios lentos o a largo plazo (Benveniste 1989;Ungerstedt 1991). De estas técnicas, la primera en desarrollarse fue la copa cortical (McIntosh y Oborin 1953), que consiste en un cilindro de reducidas dimensiones colocado sobre la superficie cerebral de modo que los compuestos del medio difunden desde éste hasta el interior de la copa, que está rellena del líquido de perfusión (Benveniste 1989;Pepeu y Giovannini 2004;Sharp y Zetterström 2007). El problema de esta técnica es que sólo puede emplearse sobre la superficie cortical, por lo que su uso es muy restringido. La técnica de perfusión *push-pull* tuvo sus inicios en los trabajos de Gaddum en los años 60 (Myers 1986;Sharp y Zetterström 2007;Chefer *et al.*, 2009) y se basa en la implantación en el animal de una cánula de diseño concéntrico de modo que mediante una bomba se puede empujar (*push*) el líquido de perfusión hacia el tejido cerebral, para después extraer (*pull*) las sustancias químicas presentes en el espacio intersticial, mediante la succión de otra bomba. Los principales inconvenientes de esta técnica se encuentran en la contaminación de las muestras obtenidas procedentes del tejido, que pueden contener proteínas que interfieran en el análisis o enzimas que degraden las moléculas objeto de estudio, y en el daño que se produce en el tejido debido a las turbulencias que pueden crearse sobre el área de contacto de la cánula con el tejido (Benveniste *et al.*, 1989;Westerink y Justice 1991). En los años 70, sin embargo, el uso de neurotransmisores o precursores metabólicos marcados radioactivamente mejoró considerablemente el análisis de las muestras de perfundido (Mora y Myers 1977).

La microdiálisis es una modificación del *push-pull*, en la que se incorpora una membrana dialítica en el extremo de la cánula concéntrica que se encuentra en contacto

con el tejido (Benveniste 1989;Ungerstedt 1991;Sharp y Zetterström 2007). La técnica se desarrolló durante finales de los años 70 y principios de los 80 en el laboratorio de Ungerstedt, en Suecia, y con el tiempo se ha perfeccionado y se ha convertido en una herramienta habitual para analizar los niveles de neurotransmisores y otras sustancias químicas no sólo en el cerebro, sino en otros órganos, y en muy diversas especies animales, incluido el hombre (Chefer *et al.*, 2009). Esta técnica presenta algunas ventajas con respecto a la perfusión *push-pull*, entre las que destacan el hecho de que la cánula de microdiálisis es un sistema cerrado, en el que se reducen al mismo tiempo la posibilidad de contaminación de la muestra con moléculas de alto peso molecular que podrían alterar la cuantificación de la sustancia química objeto de estudio, y el daño producido en el tejido por la perfusión directa del líquido a través de la cánula de *push-pull* (Di Chiara 1990b). Estos beneficios de la microdiálisis con respecto al *push-pull* motivaron, de hecho, el cambio de técnica en nuestro laboratorio en el año 1993.

Actualmente se encuentran en desarrollo las conocidas como Neuroprobes (<http://samlab.epfl.ch/page78151.html>), con la colaboración de varios centros de investigación internacionales, que pretende aunar en un sólo método la capacidad de detección y estimulación tanto eléctrica como química, mediante el uso de pequeños implantes integrados por un conjunto de microelectrodos que actúan como biosensores.

1.2.Acerca de la microdiálisis: ventajas y variables relevantes.

1.2.1.Algunos conceptos básicos.

Este método está basado en el principio de diálisis, por el cual una membrana que es permeable al agua y a pequeñas moléculas (cuyo tamaño depende de su tamaño de poro o tamaño de exclusión molecular) separa dos compartimentos fluidos. Durante la perfusión de la membrana las moléculas pueden intercambiarse por difusión en ambos sentidos obedeciendo su movimiento al gradiente de concentraciones entre el interior y el exterior de la cánula (Di Chiara 1990b;Westerink 2000). La microdiálisis pretende, por tanto, imitar la función del capilar sanguíneo mediante la perfusión de un líquido a través de la cánula de microdiálisis, de modo que el contenido del perfundido refleje la composición del líquido extracelular (Ungerstedt 1991).

Un aspecto importante a tener en cuenta en la cuantificación de neurotransmisores mediante la técnica de microdiálisis es que la concentración de la sustancia en el dializado es sensiblemente menor que la del espacio extracelular. Aunque frecuentemente ésto se ve como una limitación en la técnica, en realidad es una ventaja porque la sustancia química analizada no se retira en gran cantidad del espacio intersticial y, por tanto, el sistema no se ve excesivamente afectado (Westerink 2000). Son varios los modelos matemáticos que han tratado de calcular la concentración real de la sustancia química a partir de los datos de recuperación de la cánula y de ciertos factores físicos que se consideran importantes en dicha recuperación (Benveniste *et al.*, 1989; Justice 1993; Chefer *et al.*, 2009). Estos modelos se han aplicado fundamentalmente a los niveles basales de neurotransmisor, pues conocer sus valores reales podría informarnos sobre factores como, por ejemplo, qué significan esos valores absolutos en relación con las constantes de unión de sus receptores (Justice 1993). En el caso de los valores estimulados el cálculo es bastante más complejo. En la actualidad, la gran mayoría de los trabajos que presentan estudios de microdiálisis no calculan los valores absolutos reales de los neurotransmisores, debido a la gran cantidad de recursos necesarios para llevar a cabo esta operación, y suele optarse por presentar los datos absolutos sin la corrección correspondiente a la recuperación de la cánula de microdiálisis. Sin embargo, se han estudiado con detalle los factores que afectan a la recuperación de una sustancia química, con el fin de poder incrementar en lo posible la recogida de estas moléculas en un rango de concentración detectable mediante las técnicas empleadas para ello (Benveniste *et al.*, 1989; Chefer *et al.*, 2006).

1.2.2. Factores que afectan a la recuperación.

-El flujo de perfusión: existe una relación inversa entre el flujo de perfusión y la recuperación de sustancias químicas (Benveniste y Hansen 1991). Por tanto, reduciendo el flujo de perfusión se podrá obtener una mayor recuperación de la sustancia estudiada. Por ejemplo, a flujos en torno a 0.1 µl/min se pueden obtener niveles de recuperación en torno al 99%. Estas condiciones no son, sin embargo deseables pues se produciría una excesiva aclaración de sustancias del espacio intersticial, que podría afectar a los resultados experimentales obtenidos. Además, el emplear flujos muy bajos implica que la recogida de muestras ha de prolongarse mucho en el tiempo, por lo que para estímulos que producen cambios en unos pocos minutos, estas condiciones no serían las

más apropiadas (Westerink 2000;Chefer *et al.*, 2009). Lo más usual es emplear flujos de entre 1-2 μ l/min, que permiten una recuperación en torno al 15-20% y en un rango de tiempo que se considera adecuado (5-20min) dependiendo de la sustancia estudiada y del método de cuantificación empleado. Atendiendo a estas consideraciones, en el presente trabajo de investigación se ha empleado un flujo de 2 μ l/min.

-La longitud de la membrana de la cánula: cuanto mayor sea la longitud de la membrana, mayor será la recuperación de sustancias, dado que habrá una mayor superficie expuesta al espacio intersticial (Sarre y Michotte 2007). La longitud de membrana vendrá determinada, sobre todo por las dimensiones del área objeto de estudio. Generalmente no se emplean longitudes de membrana por debajo de 0.5mm debido a su baja recuperación (Chefer *et al.*, 2009), por lo que la microdiálisis no es adecuada para estudiar áreas de menores dimensiones que ésta. En el presente trabajo se empleó una longitud de membrana de 4mm, que permite estudiar adecuadamente la CPF medial y el hipocampo ventral.

-La composición de la membrana: los materiales deben ser inertes y no reaccionar con las sustancias presentes en el espacio intersticial o con las drogas que puedan perfundirse a través de la cánula. Por otro lado, el tamaño de poro o exclusión molecular (*cut-off*) limita el tamaño de las moléculas que pueden atravesar la membrana. Se pueden emplear membranas con diferente tamaño de poro o características químicas si se desean recoger sustancias específicas, para facilitar su difusión (Morelli *et al.*, 1991). En el caso de la presente Tesis Doctoral se emplea una membrana de cuprofano (derivado de la celulosa) con un *cut-off* de 5000Da. Las cánulas de microdiálisis empleadas en el presente trabajo de investigación se han diseñado y se construyen en nuestro laboratorio y sus características se describen en el apartado de Materiales y métodos de esta Tesis y en la bibliografía previa del laboratorio (Segovia *et al.*, 1997).

-Otros factores físicos: algunos modelos proponen como agentes fundamentales de la recuperación de la cánula la tortuosidad, es decir, la resistencia que el tejido opone al movimiento de las sustancias químicas (Benveniste *et al.*, 1989). Habitualmente la recuperación de una cánula se evalúa *in vitro* empleando patrones de concentración conocida en una solución salina, que opone mucha menos resistencia al movimiento de sustancias que el tejido, por lo que ese valor puede estar sobreestimado. En nuestro caso

los valores de recuperación (en solución salina) fueron de 10-12% para catecolaminas, 10% para acetilcolina y 15% para aminoácidos.

Algunos de los factores descritos determinan el hecho de que la microdiálisis presente una serie de ventajas que hacen que su uso se haya extendido ampliamente. Pero esta técnica también presenta una serie de desventajas que han de tenerse en cuenta. Una de ellas es la resolución temporal. Si se desean estudiar cambios rápidos en la dinámica de un neurotransmisor, sobre todo en el caso de tratar de correlacionar los cambios en la concentración de un neurotransmisor con una conducta determinada en cuestión de segundos esta técnica puede no ser la más aconsejable (Pepeu y Giovannini 2004; Grace *et al.*, 2007; Sarter *et al.*, 2009), si bien algunos diseños experimentales han permitido estudiar la dinámica de un neurotransmisor incluso en rangos de 1min (Moghaddam *et al.*, 1994). Otra desventaja, sobre todo con respecto a la voltametría se encuentra en la resolución espacial, pues el diámetro de la cánula de microdiálisis es unas 10 veces mayor que el del electrodo empleado en la voltametría (Sharp y Zetterström 2007; Baker y Kalivas 2007).

1.2.3. Factores que afectan a la elección del protocolo de microdiálisis.

Han de tenerse en cuenta ciertos aspectos de diseño experimental, como son:

-Tiempo de estabilización: cuando se introduce la cánula en el tejido se causan alteraciones en la estructura y funcionalidad del mismo. Este período puede durar entre 30min y 24 horas y entre los efectos se encuentran una liberación excesiva de neurotransmisores (provocada por daño neuronal), ruptura de la barrera hematoencefálica e isquemia en la zona adyacente a las cánulas (Di Chiara 1990b; Benveniste y Hansen 1991; Damsma y Westerink 1991; Westerink 2000; Day *et al.*, 2001; Mitala *et al.*, 2008). El diseño de la cánula puede influir en estos efectos. Así, por ejemplo, el diseño concéntrico en forma de Y, frente a los diseños en forma de U o a los transversales, permite menores diámetros de cánula, así como una longitud variable de membrana y un mejor acceso a áreas ventrales del cerebro (Morelli *et al.*, 1991; Ungerstedt 1991; Day *et al.*, 2001).

-Implantación de cánulas guía: esta característica puede ser relevante de cara al tipo de experimento que se desee realizar. La recuperación de sustancias comienza a descender a las 48-72 horas después de haber introducido la cánula de microdiálisis debido a que se forma una barrera glial en torno a la misma, que limita el paso de sustancias a la cánula (Benveniste 1989; Di Chiara 1990b; Ungerstedt 1991). Es por este motivo, que si bien para estudios farmacológicos podría emplearse la implantación de cánula de forma semicrónica (desde la cirugía estereotáxica), para estudios conductuales es más recomendable el empleo de cánulas guía, ya que permite una recuperación adecuada de los animales tras la cirugía (Westerink 2000; de Groote y Linthorst 2007). En el presente trabajo de investigación, dado que el estímulo empleado era un agente estresante y, por tanto, se trataba de estudiar una respuesta conductual, se emplearon cánulas guía con el fin de permitir la recuperación del animal durante 6-7 días tras la cirugía estereotáxica. Además, la recogida de muestras comenzó 3h después de la implantación de la cánula el día del experimento para permitir la estabilización de los niveles de neurotransmisores. Estudios iniciales en nuestro laboratorio probaron que ese período de tiempo tras la implantación asegura unos niveles basales estables de neurotransmisores. La duración total de los experimentos (desde la implantación de la cánula hasta su extracción) fue de 7 horas. Además, no se reutilizó el mismo sitio para evitar daño adicional en el tejido.

-Ritmo circadiano de los animales: una variable que puede afectar al comportamiento de los animales durante los experimentos es la fase del ciclo luz/oscuridad en la que se encuentre el animal. En el caso de los roedores, su fase de actividad es la fase oscura del ciclo, por lo que es recomendable trabajar con estos animales en ritmo invertido para desarrollar los experimentos a unas condiciones próximas a las fisiológicas (Mitsushima *et al.*, 1996; Rueter y Jacobs 1996; Castañeda *et al.*, 2004). En este trabajo de investigación se empleó un ritmo luz/oscuridad (12h/12h, luces encendidas a las 20:00h). También en este caso el empleo de cánulas guía permite que los animales recuperen su ritmo circadiano tras la cirugía (Westerink 1995).

Por tanto, las condiciones experimentales escogidas para llevar a cabo los experimentos de microdiálisis de la presente Tesis Doctoral fueron las siguientes:

Implantación de cánula	Diseño de cánula	Longitud de membrana	Tiempo de estabilización	Flujo de perfusión	Fase del ciclo
Cánulas guía	Tipo Y	4mm	3h	2µl/min	Oscuridad

1.2.4 Acerca de la composición del líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs).

El líquido perfundido a través de la cánula de microdiálisis debería poseer una composición iónica de similares características a las del líquido del medio extracelular (Morelli *et al.*, 1991; Ungerstedt 1991). Si bien en algunos casos, sobre todo durante los primeros años de desarrollo de la técnica se empleó Ringer como líquido de perfusión, hoy se opta preferentemente por el LCRs, cuya composición se ha refinado y se han ajustado las concentraciones de sus solutos para adecuarlo a las condiciones del líquido extracelular.

Entre los componentes que deben ser controlados del LCRs se encuentran las concentraciones de K^+ y Ca^{2+} , dado que la actividad neuronal depende en gran medida de éstas. Así, altas concentraciones de K^+ producen la liberación de neurotransmisor de forma inespecífica (Miyamoto *et al.*, 1991; Rosenblad y Nilsson 1993; Herzog *et al.*, 2003) e incrementos en la concentración de Ca^{2+} extracelular producen el mismo efecto (Westerink *et al.*, 1988; Damsma y Westerink 1991; Morelli *et al.*, 1991). Es importante además que las variaciones en la composición iónicas del líquido de perfusión o las drogas disueltas en éste no modifiquen el pH o la tonicidad del medio extracelular (Ungerstedt 1991). En nuestro caso, la concentración de Ca^{2+} fue 1.2mM, empleada en el laboratorio en trabajos previos (Segovia *et al.*, 2006; Del Arco *et al.*, 2007b). Esta concentración se encuentra en los niveles que se emplean habitualmente para la preparación de LCRs, y que oscilan entre 1.2µM (Hernandez *et al.*, 2006) y 3.4µM (Westerink *et al.*, 1988). Entre estos límites se ha mostrado que la relación de concentración de dopamina o acetilcolina con la de Ca^{2+} es lineal, sin embargo se ha sugerido que no sólo deben tenerse en cuenta los niveles fisiológicos de Ca^{2+} , que están en torno a 1.2mM, sino el impacto de la cánula en el tejido (que los reduce a 0.78mM, aproximadamente) y el empleo de inhibidores de la actividad enzimática de los transportadores del neurotransmisor, por lo que la concentración de Ca^{2+} puede ser aceptable dentro de ese rango propuesto, siempre que no se demuestre que afecta de forma significativa a los resultados obtenidos (Morelli *et al.*, 1991).

Un aspecto metodológico relevante en la microdiálisis, y que puede tener impacto en los resultados obtenidos mediante esta técnica, es el empleo de drogas específicas para incrementar los niveles extracelulares de un determinado neurotransmisor por encima del límite de detección del método de análisis. Estas drogas permiten prolongar el tiempo de permanencia del neurotransmisor en el espacio sináptico. En la presente Tesis Doctoral se emplearon drogas de este tipo para modificar los niveles de acetilcolina y dopamina, que se describirán a continuación.

En el caso de la acetilcolina, es usual el empleo en microdiálisis de un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, que ralentiza la degradación de la misma en el espacio sináptico y, por tanto, favorece el incremento de su concentración en el mismo (Vinson y Justice, Jr. 1997; Himmelheber *et al.*, 1998). Los inhibidores más empleados son la fisostigmina y la neostigmina. Aunque ambas drogas inhiben de forma competitiva y reversible y con similar potencia a la enzima acetilcolinesterasa, presentan algunas diferencias entre sí que hacen más recomendable el empleo de la neostigmina. Así, la neostigmina actúa a nivel del espacio extracelular, ya que su estructura cuaternaria impide su entrada en las células a través de las membranas celulares (a diferencia de la fisostigmina). Además la neostigmina no se degrada con la luz y se precisan menores concentraciones para obtener el mismo efecto que con la fisostigmina (Damsma y Westerink 1991; Day *et al.*, 2001). Aunque la neostigmina podría actuar como colinomimético, sus efectos son casi inexistentes debido a las reducidas concentraciones a las que se emplea (Damsma y Westerink 1991). En el presente trabajo se empleó una concentración de 1 μ M. Esta dosis se encuentra dentro del rango de concentraciones descrito en la bibliografía (Consolo *et al.*, 1987; Nilsson *et al.*, 1992). En muchos casos no es posible prescindir de su uso, si bien algunos trabajos han mostrado que se pueden cuantificar niveles basales de ACh *in vivo* sin necesidad de neostigmina en el LCRs (Herzog *et al.*, 2003). Se ha recomendado la interpretación cuidadosa de los resultados obtenidos gracias al empleo de neostigmina, puesto que, si bien algunos trabajos han mostrado que su actividad no interfiere con los resultados (Dewey *et al.*, 1997; Himmelheber *et al.*, 1998), en otros casos se ha mostrado que la neostigmina puede interferir en ciertos procesos fisiológicos como la autorregulación muscarínica (DeBoer *et al.*, 1990) o la dependencia de Ca^{2+} (Damsma *et al.*, 1988). Sobre todo, los efectos de la neostigmina deberían ser tenidos en cuenta al estudiar la relación del sistema colinérgico con otros sistemas de neurotransmisión.

Al igual que en el caso de la acetilcolina, los niveles basales de dopamina en la CPF recogidos mediante microdiálisis suelen encontrarse por debajo del límite de detección. Por este motivo se añade al LCRs nomifensina, un inhibidor del transportador de dopamina (Sarre y Michotte 2007). En el presente trabajo la concentración de nomifensina fue de 5 μ M, que no perturba la liberación neuronal de dopamina, de forma que, en presencia de este inhibidor, la concentración extracelular de este neurotransmisor es sensible a tetrodotoxina (TTX) y dependiente de Ca^{2+} (Butcher *et al.*, 1991; Santiago *et al.*, 1993). Aun así, es recomendable la interpretación cuidadosa de los resultados en los que se ha empleado nomifensina pues la actividad del sistema dopaminérgico puede estar alterada, aunque sea levemente, por la presencia del inhibidor.

1.3. Sobre el significado de las concentraciones de neurotransmisores recogidas mediante la técnica de microdiálisis.

Desde los inicios del empleo de la técnica de microdiálisis, el origen y significado fisiológico de los neurotransmisores recogidos ha sido objeto de debate. De hecho, la membrana dialítica, debido a sus dimensiones, no puede situarse en el espacio sináptico, por lo que se asume que los neurotransmisores y el resto de moléculas recogidos a través de la cánula proceden del espacio extracelular pudiendo éstos proceder, bien del espacio sináptico, o bien de una liberación directa al espacio extracelular (Timmerman y Westerink 1997). Es por tanto relevante, de cara a la fisiología, la farmacología o la patología de un determinado sistema de neurotransmisión, conocer la procedencia de dicha molécula (ya sea neuronal o glial), cómo ha alcanzado el espacio extracelular (mediante exocitosis, metabolismo, reversión de transportadores, excitotoxicidad), o cómo diversas manipulaciones experimentales afectan a su concentración extracelular (Rea *et al.*, 2005).

La procedencia de los neurotransmisores recogidos mediante microdiálisis es uno de los aspectos más relevantes relacionados con esta técnica. Fundamentalmente se han empleado dos criterios para la determinación del origen neuronal de los neurotransmisores recogidos mediante microdiálisis. El primero es el bloqueo mediante TTX. Esta toxina bloquea los canales de Na^+ dependientes de voltaje que permiten la propagación del impulso nervioso. El segundo criterio es la dependencia de las

concentraciones de Ca^{2+} , de modo que la retirada de este ión del espacio extracelular no permitiría la entrada del mismo necesaria para el proceso de exocitosis del neurotransmisor desde las neuronas. Por tanto, la disminución de la concentración basal de un determinado neurotransmisor en torno al 70%, provocada por la perfusión de TTX o por la retirada de Ca^{2+} del medio extracelular se considera como un buen indicador del origen neuronal de dicho neurotransmisor (Consolo *et al.*, 1987; Westerink *et al.*, 1987; Damsma *et al.*, 1988; Morelli *et al.*, 1991; Timmerman y Westerink 1997; Del Arco *et al.*, 2003).

1.3.1. Origen de la concentración extracelular de acetilcolina y dopamina.

Las aminas biógenas, y entre ellas la dopamina y la acetilcolina, se encuentran fundamentalmente localizadas en neuronas (Seiden *et al.*, 1993; Pepeu y Giovannini 2004), y una vez liberadas al espacio sináptico pueden difundir al espacio extracelular (Zoli y Agnati 1996; Descarries *et al.*, 1997; Zoli *et al.*, 1998). Además se han descrito terminaciones no sinápticas que liberan dopamina y acetilcolina al espacio extracelular (Descarries *et al.*, 1991; Goldman-Rakic 1998; Zoli *et al.*, 1998). Se considera que las concentraciones extracelulares medidas mediante microdialisis de dopamina y acetilcolina son de origen neuronal, ya que en ambos casos dichas concentraciones se reducen drásticamente en presencia de TTX o en ausencia de Ca^{2+} (Westerink *et al.*, 1988; Di Chiara 1990a; Westerink 2000; Pepeu y Giovannini 2007). Las concentraciones de dopamina y acetilcolina recogidas en los dializados no se puede afirmar que guarden una relación lineal con la concentración en su sitio de liberación, debido a que estas moléculas han de difundir desde ese lugar hasta la membrana de sonda de microdialisis y además habrá mecanismos de aclaramiento, que reducirán la concentración de los neurotransmisores antes de alcanzar la misma (Morelli *et al.*, 1991).

1.3.2. Origen de la concentración extracelular de glutamato.

En el caso del glutamato existe controversia con respecto a su origen. El glutamato se puede encontrar en el interior de las neuronas, pero también en el interior de los astrocitos (Haydon 2001), e incluso puede provenir del plasma tras atravesar la barrera hematoencefálica (Timmerman y Westerink 1997).

A diferencia de la dopamina o la acetilcolina, los niveles basales extracelulares de glutamato y GABA son insensibles o no se reducen más de un 40-50% en presencia de TTX o con bajas concentraciones de calcio (Morelli *et al.*, 1991; Timmerman y Westerink 1997; Del Arco *et al.*, 2003; Baker y Kalivas 2007), lo que sugiere que, al menos, el glutamato y GABA extracelulares basales no tendrían un origen neuronal. Algunos autores, sin embargo, han mostrado que ciertas estimulaciones químicas, eléctricas o conductuales producen incrementos de glutamato extracelular que son sensibles a TTX y dependientes de Ca^{2+} (Moghaddam 1993; Miele *et al.*, 1996; Lada *et al.*, 1998; You *et al.*, 1998). De hecho, se ha descrito un proceso denominado *spill-over* mediante el cual el glutamato podría abandonar el espacio sináptico para alcanzar el espacio extracelular, pero este fenómeno sólo tendría lugar ante estimulaciones altas de las neuronas glutamatérgicas y además no se presenta de forma generalizada en el cerebro (Del Arco *et al.*, 2003; Westerink *et al.*, 2007).

En esta controversia sobre el origen del glutamato extracelular juegan un papel crucial los astrocitos. La sinapsis glutamatérgica se caracteriza por ser “cerrada” de modo que el espacio sináptico queda rodeado por astrocitos, que presentan una alta densidad de transportadores de glutamato y que, por tanto, hacen difícil que éste pueda salir al espacio extracelular (Clements 1996; Rothstein *et al.*, 1996). De hecho, Zoli *et al.* (1999) diferenciaron dos compartimentos con respecto al glutamato: uno, el sináptico, y otro, el extracelular, en los que este neurotransmisor podría ejercer funciones diferentes. Los astrocitos, por tanto, pueden controlar de forma fina la salida de glutamato desde el espacio sináptico al espacio extracelular, pero además presentan en su interior glutamato, que no sólo juega un papel en el metabolismo del mismo, para ser después incorporado a las neuronas, sino que los propios astrocitos son capaces de liberar glutamato, ya sea al espacio extracelular o al propio espacio sináptico (Haydon 2001; Pasti *et al.*, 2001; Perea *et al.*, 2009). Esta liberación puede darse mediante procesos no exocitóticos, como la reversión del transportador glutamato/cisteína que, de hecho, se cree que podría explicar en torno al 60% de los niveles basales de glutamato extracelular en el núcleo accumbens o en la CPF (Baker y Kalivas 2007), o bien a través de una liberación exocitótica similar a la neuronal (Pasti *et al.*, 2001). No se sabe aún si esta forma diferente de liberación podría ser exclusiva de uno u otro compartimento (extracelular o sináptico). Esta relación funcional neurona-glía, además de la escasa respuesta de los niveles de glutamato a TTX o Ca^{2+} , en algunos casos incluso tras

estimulación conductual, llevó a Del Arco et al. (2003) a proponer dos hipótesis con respecto a los niveles de glutamato y GABA extracelulares: 1) los cambios de concentraciones de glutamato en respuesta a tratamientos específicos podrían ser expresión de la actividad de la unidad astrocito-neurona en circuitos específicos del cerebro; 2) esos cambios podrían ser un índice de acciones mediadas por transmisión por volumen donde los astrocitos liberan glutamato al compartimento extracelular y difunden a través de él (Zoli *et al.*, 1999).

En parte, por tanto, el origen del glutamato extracelular obtenido mediante microdiálisis *in vivo*, aún sigue siendo controvertido (Timmerman y Westerink 1997; Del Arco *et al.*, 2003).

1.3. Sobre el análisis cromatográfico.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) supuso un gran empuje al desarrollo de la técnica de microdiálisis, pues este método permite la detección y cuantificación de sustancias de diversa naturaleza molecular, con alta sensibilidad (rango femtomolar) y gran capacidad de resolución (Westerink 2000; Day *et al.*, 2001; Chefer *et al.*, 2009). La HPLC permite utilizar pequeños volúmenes de muestra, métodos de derivación simples, un reducido tiempo de análisis y posee, además, un coste menor que otros métodos cromatográficos (Lindroth y Mopper 1979; Venema *et al.*, 1983; Allison *et al.*, 1984; Peinado *et al.*, 1986). Si bien las primeras moléculas que se analizaron fueron los aminoácidos, los primeros estudios sistemáticos empleando esta técnica se aplicaron a la detección de las monoaminas (Morelli *et al.*, 1991; Sarre y Michotte 2007) y posteriormente se ha ampliado al estudio de muchas otras moléculas.

1.3.1. Sobre el análisis de catecolaminas.

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado la detección de tipo electroquímico para la detección de dopamina porque proporciona unos límites de detección en el rango femtomolar, un menor coste y mayor facilidad de manejo que otros métodos, como los detectores de fluorescencia, o la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Anderson 1993; Carter 1994; Westerink 2000; Freeman *et al.*, 2003), a pesar de que estos últimos puedan poseer una mayor selectividad o sensibilidad.

El análisis de las catecolaminas se realizó mediante un detector coulométrico en el que la muestra pasa a través de un electrodo a modo de filtro y no sólo contacta con su superficie (como en el detector amperométrico), por lo que virtualmente todas las moléculas susceptibles de ser oxidadas o reducidas van a ser expuestas al potencial. Además, permite oxidar o reducir las sustancias previamente a su paso a la célula analítica (Sarre y Michotte 2007). Se empleó una célula analítica con dos canales (electrodos) dispuestos en serie. Mediante la modificación de los potenciales de cada canal se pueden optimizar la sensibilidad y la especificidad del análisis (Anderson 1993). En nuestro caso, la concentración de dopamina se encuentra habitualmente en torno a 0.25-0.40nM, y nuestro límite de detección es de 0.15nM.

Uno de los inconvenientes de la detección electroquímica es que es muy sensible al flujo, por lo que es fundamental que la elución de la fase móvil carezca de pulsatilidad (lo que se consigue empleando una bomba que mantenga un flujo constante) (Anderson 1993;Freeman *et al.*, 2003). Un segundo problema que plantea es su menor selectividad que la detección fluorométrica, debido a que diversas sustancias presentes en la muestra pueden presentar potenciales de óxido-reducción similares a los de la molécula que se desea analizar (Anderson 1993). Puesto que tanto el LCRs como la fase móvil presentan moléculas susceptibles de ser oxidadas o reducidas, se observa una cierta señal de fondo o “ruido” en la línea base del cromatograma. Esta razón señal-ruido puede atenuarse mediante el uso de gradientes, de una pre-columna o mediante la inclusión de una célula de guarda anterior a las células analíticas (Anderson 1993).

En cuanto a la fase móvil, en la detección electroquímica es esencial la composición de la misma con el fin de optimizar la separación y resolución de los picos (Freeman *et al.*, 2003). En el presente trabajo la composición de la fase móvil fue definida de forma empírica modificando la concentración de sulfonato sódico y/o metanol hasta lograr una buena separación del pico correspondiente a dopamina, que aparece, con estas condiciones en torno a los 5.5min (ver cromatograma en la Figura 5 de Materiales y Métodos).

1.3.2. Sobre el análisis de acetilcolina.

La introducción de un método cromatográfico rápido, fiable y reproducible para el análisis de acetilcolina contribuyó significativamente al estudio in vivo de los sistemas colinérgicos en las dos décadas anteriores. El método descrito por Potter *et al.* (1983) consiste en una separación de moléculas mediante HPLC, una reacción enzimática postcolumna y su posterior detección electroquímica, que solventa los problemas que crea el hecho de que la acetilcolina sea una molécula difícilmente oxidable, además de su baja absorción de luz ultravioleta. De este modo, se consigue la producción de peróxido de hidrógeno, que puede ser oxidado o reducido según el potencial aplicado (Damsma y Westerink 1991).

Las columnas más habitualmente empleadas para separar acetilcolina y colina son las de intercambio iónico (Damsma *et al.*, 1988; DeBoer *et al.*, 1990; Day *et al.*, 2001). Actualmente se dispone de las columnas *microbore*, de reducido diámetro que proporcionan una alta sensibilidad y requieren un menor volumen de muestra, un tiempo de análisis más corto y menor gasto de fase móvil (Tsai *et al.*, 1996; Carter y Kehr 1997). En el presente trabajo se empleó una columna *microbore* de intercambio catiónico para la separación de la acetilcolina y un reactor enzimático donde se encuentran covalentemente unidas las enzimas acetilcolinesterasa (que transforma la acetilcolina en colina y acetato) y la colinoxidasa (que convierte la colina en betaína y peróxido de hidrógeno). El peróxido de hidrógeno resultante de estas reacciones enzimáticas es proporcional a la concentración de acetilcolina y colina que contiene la muestra inyectada.

Es importante evitar el sobrecrecimiento bacteriano en el sistema, y específicamente en el reactor enzimático, ya que la presencia de bacterias que presentan la enzima catalasa podrían degradar el peróxido de hidrógeno, afectando por tanto, a los resultados obtenidos. Para minimizar este riesgo, se añadió a la fase móvil un bacteriostático. Además, no se permitió la recirculación de la fase móvil y se sustituyó cada 5-6 días por una solución fresca.

Se ha descrito que concentraciones de neostigmina de hasta 10 μ M en el LCRs empleado en las microdiálisis no afectan a la eficiencia de la acetilcolinesterasa del reactor, y

concentraciones superiores (de hasta 1mM) producen un efecto inhibitor, con pérdida transitoria del pico correspondiente a la acetilcolina. Dado que la concentración de neostigmina disuelta en el LCRs utilizado fue de 1 μ M puede descartarse esa interacción sobre el proceso de detección de la acetilcolina.

1.3.3.Sobre el análisis de aminoácidos.

Para la detección de aminoácidos se emplea habitualmente un detector de fluorescencia. Para ello es necesaria una derivatización previa de las muestras, que contribuye a incrementar la sensibilidad y selectividad del análisis. En el presente trabajo se empleó la formación de OPA-derivados (con o-ftaldehído), que son compuestos que emiten una respuesta fluorescente intensa en un corto tiempo de reacción, aunque estos compuestos son bastante inestables (Lindroth y Mopper 1979; Sarre y Michotte 2007). Para la formación de los OPA-derivados es necesaria la presencia de una molécula que presente al menos un grupo tiol como auxiliar de la reacción, del que dependerá en gran medida la intensidad de la fluorescencia y la estabilidad del compuesto. En este trabajo se eligió el mercaptopropiónico y, además, para reducir la influencia de la inestabilidad de los compuestos en la cuantificación posterior se estableció un tiempo constante de demora entre la adición del reactivo y la inyección de la muestra en el cromatógrafo (45s).

Se utilizó una columna de 15cm de longitud con el fin de optimizar la resolución de los picos sin prolongar demasiado el tiempo de análisis (Venema *et al.*, 1983). Dado que las muestras recogidas representan mezclas complejas, es decir, con diferentes polaridades, se estableció una elución en gradiente de tipo binario (con fases móviles), que permitió optimizar la separación de los picos en un tiempo de análisis de 16min. La principal precaución que se debe tomar cuando se emplean gradientes es el restablecimiento de las condiciones iniciales, que en el caso del presente trabajo tuvo lugar en 4min.

Varios autores han demostrado previamente que el análisis de aminoácidos mediante HPLC acoplada a detección tanto fluorométrica como electroquímica, es un método sensible y reproducible para el estudio de los niveles endógenos de aminoácidos (Venema *et al.*, 1983; Peinado *et al.*, 1986). La elección de un detector de tipo fluorométrico para el análisis de aminoácidos se debió a que éste proporciona más estabilidad al análisis que el de tipo electroquímico. Este método presenta linealidad

estadística en el rango de concentraciones entre 1pmol y 10mmol con volúmenes de muestra comprendidos entre 5 y 500µl (Peinado *et al.*, 1986). En nuestro caso empleamos volúmenes de muestra de 6µl añadidos a otros 6µl que contienen un estándar interno (homoserina), que proporciona una mayor fiabilidad en la cuantificación. Con las condiciones empleadas en este trabajo, somos capaces de detectar hasta 12 aminoácidos diferentes, entre los que se encuentran glutamato, GABA, taurina, glicina o aspartato, en un tiempo de 16.5min (ver Figura 9 en Materiales y Métodos).

2.Sobre el modelo de enriquecimiento ambiental.

2.1.Evaluación crítica del modelo.

2.1.1. Ambiente natural frente a modelo experimental.

Existen dos perspectivas distintas que tienen como objetivo el estudio del EA: una primera, que se centra en los efectos del mismo sobre ciertos parámetros cognitivos y moleculares relativos al desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, que están relacionados con la modulación que el ambiente ejerce sobre los fenómenos de plasticidad cerebral (van Praag *et al.*, 2000); una segunda, que se centra en el cuidado y mantenimiento de los animales de laboratorio y evalúa parámetros fisiológicos que son indicadores de la salud y bienestar de éstos (Olsson y Dahlborn 2002). Aunque los objetivos de sendas perspectivas son diferentes, sus resultados, sin embargo, pueden ser complementarios. En la presente Tesis Doctoral el EA ha sido evaluado bajo la primera de estas perspectivas, aunque sin desdeñar las conclusiones que pudiesen derivarse del trabajo que afectasen a la segunda de ellas.

Mediante el empleo del EA se proporcionan a los animales unas condiciones ambientales que se asemejan, en ciertos aspectos, al ambiente natural en el que éstos se desarrollan (Newberry 1995;van Praag *et al.*, 2000). Pueden plantearse dos consideraciones con respecto a esta idea: algunos autores proponen que las condiciones de EA son enriquecidas con respecto a las condiciones estándar de laboratorio, ya que las primeras son más semejantes a las condiciones naturales (Würbel 2001;Rosenzweig 2003;Laviola *et al.*, 2008). Otros autores, por el contrario, consideran que el modelo de

EA no pretende reproducir las condiciones naturales de vida de los animales, ya que mientras que el comportamiento de los animales en la naturaleza viene dado por la necesidad y la supervivencia, en el EA sería dirigido por una combinación de curiosidad, juego y aprendizaje (Sale *et al.*, 2009). La primera de estas perspectivas cuenta con un mayor apoyo empírico. Por ejemplo, un trabajo reciente ha mostrado que ratones salvajes cazados en la ciudad muestran una LTP incrementada con respecto a ratones de laboratorio mantenidos en condiciones estándar (Zhao *et al.*, 2009). En otras especies diferentes a los roedores se han encontrado resultados similares. Así, en un trabajo en el que se ha estudiado la neurogénesis en el hipocampo de carboneros de capucha negra (*Parus atricapillus*) se ha mostrado que ésta es mayor en aquellos carboneros a los que se les deja en libertad tras inyectarles timidina tritiada, que aquellos que permanecen en un aviario tras la inyección y hasta su posterior análisis (Barnea y Nottebohm 1994). Asimismo, el cerebro de los salmónidos de la especie *Oncorhynchus mykiss* criados en libertad presenta un mayor volumen que el de los que son criados en cautividad, y esta diferencia se puede reducir incrementando la complejidad del ambiente en el que se desarrollan los alevines en cautividad de esta especie (Kihlslinger y Nevitt 2006). Además, se ha observado en diversas especies que el volumen de ciertas áreas cerebrales es mayor en animales en libertad que en animales domésticos (Ebinger 1995). Dado que estos mismos parámetros (volumen cerebral, neurogénesis en el hipocampo, LTP) se han encontrado incrementados en animales mantenidos en condiciones de EA, estos trabajos sugieren que las condiciones de EA se asemejan a las condiciones naturales de esos animales y que, por tanto, las condiciones de estabulación habitualmente empleadas en los laboratorios serían, de algún modo, condiciones empobrecidas con respecto al modelo de EA.

El desarrollo de cualquier ser vivo, desde un punto de vista evolutivo, viene dado por una expresión diferencial de genes que depende en gran medida de las condiciones ambientales en las que el individuo se desarrolle, y que ha sido perfilada por el proceso evolutivo durante millones de años. En el caso de un animal en cautividad, teóricamente cuanto más semejantes sean sus condiciones de cría a aquellas que se dan en la naturaleza, más favorecido se verá su desarrollo. Sin embargo, algunos autores consideran que los animales de laboratorio, debido a que se han mantenido en cautividad durante miles de generaciones, podrían haber desarrollado adaptaciones al medio en el que viven actualmente (Newberry 1995; Benefiel *et al.*, 2005). Sin embargo,

se ha observado que los animales de laboratorio desarrollan comportamientos naturales si se dan las condiciones propicias para ello. Por ejemplo, tanto los ratones como las ratas construyen nidos si se introduce material adecuado para la construcción de los mismos en sus jaulas (Olsson y Dahlborn 2002; Smith y Corrow 2005). También se observan respuestas conductuales, neuroquímicas y endocrinas de estrés ante la presencia de un depredador natural, incluso aunque no hayan tenido contacto previo con él (Morrow *et al.*, 2000; Woodson *et al.*, 2003). Estas observaciones no excluyen sin embargo que ciertos genes, de menor relevancia para la supervivencia, puedan haber sufrido cambios durante el tiempo que han permanecido los animales de laboratorio en condiciones de estabulación (en el caso de las ratas, aproximadamente unos 200 años). Por otro lado, y en relación con los estudios de envejecimiento, no es común que en la naturaleza los animales alcancen su esperanza de vida máxima, debido a los depredadores o a la muerte por inanición, por lo que las condiciones de laboratorio podrían no asemejarse en ese sentido a las naturales y sería difícil simularlas por la escasez de datos al respecto.

Las evidencias hasta ahora expuestas sugieren, en conjunto, que el EA constituye un modelo experimental que proporciona unas condiciones “artificiales” a los animales que serían intermedias entre las condiciones naturales y las condiciones estándar o de aislamiento habitualmente empleadas en los laboratorios (ver más adelante). El EA favorece, por tanto, la estimulación sensorial y motora, así como la interacción social de los animales, pero sin riesgo para su supervivencia. Estas condiciones constituyen, por tanto, un modelo experimental idóneo para el estudio de los cambios que un ambiente rico en estímulos puede producir sobre diferentes sistemas fisiológicos y, entre ellos, y particularmente, sobre la plasticidad cerebral.

2.1.2.¿Qué grupos controles han de ser empleados?

El aspecto metodológico que más críticas ha recibido con respecto a los trabajos que estudian los efectos del EA son las condiciones de los grupos controles empleados. En los trabajos que incluyen el EA como variable de estudio se emplean habitualmente como controles las condiciones estándar (entre 2 y 4 animales por jaula, sin objetos), o condiciones de aislamiento (1 animal por jaula, sin objetos). En el caso de las condiciones estándar, los animales carecen de la estimulación sensorial proporcionada

por los objetos, si bien disponen de interacción social. En el caso del aislamiento, los animales carecen tanto de interacción social como de objetos. En este último caso, de hecho, se ha mostrado que los animales mantenidos en aislamiento pueden presentar cambios importantes en la respuesta a estrés o en el sistema dopaminérgico, por lo que al evaluar los efectos del EA no es posible separar adecuadamente éstos de los efectos deletéreos del aislamiento (Mirmiran *et al.*, 1986; Robbins *et al.*, 1996; Würbel 2001; Fone y Porkess 2008), si bien estos efectos suelen tener lugar de forma más acusada cuando el aislamiento se produce durante la etapa puberal. Por otro lado, también se ha descrito que los animales mantenidos en condiciones estándar o de aislamiento muestran mayores niveles de estereotipias que animales en libertad o en condiciones de EA, lo que podría suponer un síntoma de condiciones fisiológicas anormales (Turner y King 2003; Garner 2005). Estos efectos en los animales en condiciones estándar o aislados han conducido a la propuesta de que tanto las condiciones estándar como las condiciones de aislamiento podrían no ser apropiadas para la investigación que depende de un funcionamiento normal del sistema nervioso, al menos en un determinado tipo de trabajos científicos (Würbel 2001; Olsson y Dahlborn 2002; Laviola *et al.*, 2008).

En los trabajos que emplean el EA como modelo experimental no hay un consenso establecido sobre la dirección en la que orientar los resultados. Algunos trabajos, como el de Meléndez *et al.* (2004), han optado por la orientación etológica de los resultados considerando las condiciones de EA como grupo control, mientras que el grupo de estudio es el llamado “empobrecimiento ambiental”, que en este caso lo constituyen animales aislados. Otros trabajos, sin embargo, oponen unas condiciones a las otras sin tomar a ninguno de ellos por grupo control (Larsson *et al.*, 2002; Pham *et al.*, 2002) e incluso algunos, para evitar las connotaciones positivas que crea el término “enriquecimiento” emplean los términos “complejidad” (Black *et al.*, 1987) o “suplementación” (Benefiel *et al.*, 2005). Sin embargo, lo más frecuente es encontrar artículos que empleen como variable de estudio el EA manteniendo como grupo control animales en condiciones estándar o de aislamiento (Klein *et al.*, 1994; Moncek *et al.*, 2004; Del Arco *et al.*, 2007a; Hoffmann *et al.*, 2009).

Por último, como han propuesto Laviola *et al.* (2008), el hecho de que los animales habitualmente empleados como controles se encuentren en condiciones estándar o de

EA, puede dar lugar a interpretaciones erróneas de resultados, e incluso a poner en cuestión ciertos modelos de enfermedades psiquiátricas o neurológicas cuya aparición depende de factores tanto genéticos como ambientales. Por ejemplo, se pueden inducir ciertos síntomas depresivos mediante la separación materna o el estrés prenatal a individuos mantenidos en condiciones estándar, pero no si estos animales se encuentran en condiciones de EA. Por tanto, y dado que la aparición de estos síntomas presumiblemente depende de una predisposición biológica (estrés prenatal o separación materna) añadida a unas condiciones ambientales adversas, los autores se plantean si no sería más acertado preguntarse por qué animales en condiciones estándar sí desarrollan estos síntomas aun cuando supuestamente se encuentran en unas condiciones ambientales que no deberían permitir la aparición de los mismos. Este mismo planteamiento puede formularse para otros modelos animales, como los de enfermedades de Alzheimer o Parkinson, en los que se ha sugerido que el EA jugaría un papel protector (Li y Tang, 2005; Nithianantharajah y Hannan 2006). Es posible que los animales en condiciones estándar sean más vulnerables que los mantenidos en EA al ser afectados por esos tratamientos, de modo que en lugar de estar trabajando con un modelo de protección (el EA) se esté trabajando con un modelo de vulnerabilidad incrementada (condiciones estándar). El caso de los ratones *knockout* también es relevante a este respecto, pues algunos modelos que muestran ciertos déficits, por ejemplo a nivel cognitivo, ven atenuados éstos cuando son mantenidos en condiciones de EA (Rampon *et al.*, 2000b). Es por estos motivos que Laviola *et al.*, (2008) proponen el empleo de animales en condiciones de EA como grupo control en este tipo de experimentos.

En el caso de la presente Tesis Doctoral se eligieron un grupo mantenido en condiciones de EA y otro grupo control en el que los animales fueron mantenidos individualmente en sus jaulas. Aunque los animales del grupo control fueron aislados, eran animales adultos jóvenes, sobre los que el aislamiento no ejerce tantos efectos negativos como en el caso de la etapa puberal. La elección de estos dos grupos experimentales se basó en el intento de maximizar las posibles diferencias que pudieran encontrarse entre los grupos experimentales, algo que era conveniente para la naturaleza esencialmente descriptiva del estudio.

2.2. Variables relevantes del EA y estandarización.

Los diferentes trabajos que estudian el EA emplean muy diversos protocolos de diseño experimental, que varían en las dimensiones de la jaula, el número de individuos, el número y tipo de objetos, la presencia o no de ruedas para la realización de ejercicio físico, la duración del EA, la edad de aplicación del mismo a los animales o incluso la variedad de comida proporcionada a los animales (Fox *et al.*, 2006; Nithianantharajah y Hannan 2006).

Algunos trabajos han tratado de dilucidar cuáles son las variables que están más involucradas en los efectos del EA sobre la plasticidad del sistema nervioso. Un estudio inicial estudió si la simple estimulación visual, olfativa y auditiva era suficiente para lograr los efectos del EA sobre el volumen de la corteza cerebral (Ferchmin y Bennett 1975). Este trabajo mostró que aquellas ratas a las que se introducía en una caja de EA pero confinadas en una caja más pequeña sin tener un contacto directo con los elementos del EA no muestran los efectos que habitualmente producen estas condiciones sobre el desarrollo y volumen del cerebro, mientras que las ratas que tienen contacto directo con las condiciones de EA sí muestran esos efectos. Otro elemento del EA que se ha estudiado por separado es el ejercicio físico. Éste, al igual que el EA, mejora la memoria espacial e incrementa los niveles de neurogénesis y de diversos factores neurotróficos (van Praag *et al.*, 1999; Cotman y Berchtold 2002), por lo que se ha sugerido que sus efectos pueden contribuir, al menos en parte, a los efectos del EA. Otro de los componentes del EA es el ambiente social, que habitualmente no es suficiente para explicar los efectos del primero (van Praag *et al.*, 2000). Con respecto al ambiente físico (número y variedad de objetos, dimensiones de la jaula), varios trabajos han estudiado su efecto dentro de los efectos generales del EA, si bien no parece tener un papel decisivo entre éstos. Más bien parece que es la interacción de estas variables (ejercicio, interacciones sociales y ambiente físico) la que determina los efectos del EA (van Praag *et al.*, 2000).

Algunos autores han propuesto que la introducción de las condiciones de EA en los grupos control podría incrementar la variabilidad de las medidas y, por tanto, afectar a la precisión y reproducibilidad de los resultados (Benefiel *et al.*, 2005). Por este motivo, Wolfer *et al.* (2004) llevaron a cabo un estudio en el que en tres laboratorios distintos se

realizaron diversas pruebas conductuales a animales mantenidos en condiciones estándar y de EA y analizaron si la variabilidad de estos dos grupos era diferente en esos parámetros conductuales. La principal conclusión del trabajo es que el EA no incrementa la variabilidad de los resultados, lo que indica que el EA no incrementa el riesgo de encontrar resultados contradictorios entre laboratorios. Por tanto, este trabajo sugiere que las discrepancias observadas en los resultados de los laboratorios que trabajan con el modelo de EA no parecen deberse al modelo en sí, aunque en el estudio se controlan ciertas variables como el tipo de caja, la duración del EA y los objetos empleados, así como el período de recambio de los objetos y de reorganización de la jaula, que sí pueden influir en la variabilidad de los resultados.

Existe la posibilidad de que ciertas variables sean más sensibles a pequeños cambios ambientales (y por tanto, al protocolo de EA empleado) que otras. Así, tomando como ejemplo la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, se puede señalar que mientras algunos trabajos muestran que los niveles basales de CORT son mayores en los animales mantenidos en EA (Marashi *et al.*, 2003; Moncek *et al.*, 2004), otros sugieren que, o bien no son diferentes (Mlynarik *et al.*, 2004), o incluso son menores en los animales mantenidos en EA (Belz *et al.*, 2003). Se ha sugerido que estas discrepancias son debidas a los diferentes protocolos de EA empleados (Fox *et al.*, 2006). De hecho, los distintos trabajos que emplean el EA como modelo muestran unos niveles de estandarización bajos (ver Tabla 1).

Pero, ¿es deseable la estandarización? Si bien ésta asegura una mayor precisión y reproducibilidad de los resultados, algo deseable en la práctica científica, puede ocurrir que éstos terminen siendo idiosincráticos con respecto a la metodología empleada o al laboratorio del que procedan (Würbel 2002). Así, Würbel propone, por ejemplo, emplear distintas cepas de animales en el mismo estudio o permitir cierta variabilidad controlada en las condiciones de los experimentos, pues de ese modo los resultados obtenidos serán más robustos, aunque se obtengan a costa de cierta precisión en los resultados. En el trabajo de Wolfer *et al.* (2004), aunque se observó un cierto efecto estadístico del laboratorio y la cepa de los animales sobre los resultados, este efecto fue más cuantitativo que cualitativo, puesto que la dirección de los efectos del EA sobre las diversas variables no se vio modificada. Estos resultados apoyan la robustez de los efectos observados. Por tanto, la estandarización es deseable hasta el punto en el que

permita la reproducibilidad de resultados, pero sin caer en la idiosincrasia de los mismos. Pero, por otro lado, la variabilidad en la metodología de los trabajos puede contribuir a la robustez de los resultados, aún a costa de cierta precisión en los mismos. Un ejemplo lo podemos encontrar en la respuesta a estrés de los animales mantenidos en condiciones de EA. Así, mientras que hay cierta discusión con respecto a los niveles basales de CORT en los animales mantenidos en EA con respecto a sus controles, parece haber un consenso acerca de que los animales mantenidos en EA muestran una respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal atenuada con respecto a sus controles, sean éstos aislados o en condiciones estándar (Belz *et al.*, 2003; Moncek *et al.*, 2004; Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Mlynarik *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2009) (ver Tabla 2).

En la presente Tesis Doctoral las condiciones de mantenimiento de los animales fueron establecidas en base a bibliografía previa. La estandarización de las condiciones de EA consistió en emplear jaulas de grandes dimensiones (120x100x60cm), en las que se cambiaron los objetos y la disposición de las tuberías presentes en la jaula de forma semanal, sin patrones determinados ni un número de objetos concreto. El número de animales por jaula fue siempre de entre 10 y 12 animales.

Autores	Especie	Cepa	A/C	Edad	T de EA	Cont	Efecto
Belz et al. (2003)	Rata	SD	1	2m	-	A	↓
Sztainberg et al. (2010)	Ratón	C57BL	12	1m	1m	A/E	↓
Benaroya-Milhstein et al. (2004)	Ratón		10	1m	1.5m	E (10)	↑
Marashi et al. (2003)	Ratón		4	22d	2m	E/EA	↑
Moncek et al. (2004)	Rata	W	10	-	40d	E	↑
Falkenberg y cols., (1992)	Rata	SD		2m	1m	A	=
Mlynarik et al. (2004)	Rata	W	10	2m	1m	E	=
Peña et al., (2009)	Rata	SD	12/14	21d	3m	E	=

Tabla 1. Efecto de diferentes protocolos experimentales empleando el modelo de EA sobre los niveles plasmáticos basales de CORT. Abreviaturas: A/C: animales por jaula; T de EA: tiempo de EA; Cont: grupo control empleado; A: aislamiento; E: estándar;

Autores	Especie	Cepa	A/J	Edad	T de EA	Cont	Efecto
Belz et al. (2003)	Rata	SD	1	2m	-	A	= (tend)
Benaroya-Milhstein et al. (2004)	Ratón		10	1m	1.5m	E (10)	↓
Moncek et al. (2004)	Rata	W	10	-	40d	E	↓
Mlynarik et al. (2004)	Rata	W	10	2m	1m	E	↓
Peña et al., (2009)	Rata	SD	12/14	21d	3m	E	↓
Sztainberg et al., (2010)	Ratón	C57BL	12	1m	1m	A/E	↓

Tabla 2. Efecto de diferentes protocolos experimentales empleando el modelo de EA sobre la liberación de CORT en respuesta a estrés. Abreviaturas: A/C: animales por jaula; T de EA: tiempo de EA; Cont: grupo control empleado; A: aislamiento; E: estándar; tend: tendencia.

2.3. Relevancia del modelo de EA en humanos.

El EA, como se ha mencionado anteriormente, es un modelo animal que permite estudiar los procesos de plasticidad del cerebro (Mora *et al.*, 2008). Un conocimiento adecuado de estos procesos podría permitir su aplicación para fines tan diversos como la recuperación de facultades perdidas tras una isquemia, la ralentización en el progreso de enfermedades neurodegenerativas, o la atenuación de los déficits cognitivos asociados a la edad. Se han realizado a este respecto diversos trabajos prometedores con modelos animales (Li y Tang 2005; Mora *et al.*, 2007; Petrosini *et al.*, 2009; Nithianantharajah y Hannan 2009). La cuestión más importante acerca de este modelo es su aplicabilidad al modelo humano.

En el ser humano ha sido ampliamente descrito, en términos generales, un declinar cognitivo con la edad, que se manifiesta en déficits en memoria de trabajo, en memoria episódica, en habilidades lingüísticas o en velocidad de procesamiento de información (Kramer *et al.*, 2004; Mahncke *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2002; Stern 2009). Sin embargo, la aparición y progresión de estos déficits asociados a la edad es variable en la población (Yaffe *et al.*, 2009). Se ha observado que incluso hasta un 25% de los individuos diagnosticados *post-mortem* como enfermos de Alzheimer, no mostraron una historia clínica con deterioro cognitivo (Stern 2009). Por tanto, esta variabilidad individual en la aparición de síntomas cognitivos o incluso de demencias, ha llevado a diversos investigadores a estudiar cuáles son los factores que podrían predecir la aparición de estos síntomas.

Entre los factores que pueden predecir, al menos en parte, la aparición de déficits cognitivos asociados a la edad, o incluso la aparición de demencias se encuentran algunos de origen genético y otros de origen ambiental, si bien hoy se piensa que no son componentes separados entre sí, sino que es la relación entre ambos la que determina la aparición de las patologías asociadas al envejecimiento (Mora, 2000). Entre los factores de origen genético se han propuesto la presencia del alelo apoE4, un historial familiar de demencias o el sexo del individuo (Anstey y Chistensen 2000; Yaffe *et al.*, 2009). Pero los factores que más interés han suscitado entre los investigadores son los de origen ambiental, dado que éstos, en caso de conocerse, podrían modificarse más fácilmente que los de origen genético. Entre los factores de origen ambiental se

encuentran el nivel de estudios, el tipo de actividades cognitivas realizadas durante el tiempo de ocio, la demanda cognitiva que requiera el trabajo desempeñado a lo largo de la vida o el ejercicio físico (Anstey y Chistensen 2000; Wilson *et al.*, 2002; Yaffe *et al.*, 2009).

Basados en estos datos, se han diseñado diferentes protocolos de entrenamiento cognitivo en humanos con el fin de atenuar o incluso revertir los déficits cognitivos asociados a la edad (Milgram *et al.*, 2006). Sin embargo, la eficacia de estos métodos de entrenamiento cognitivo es, de momento, reducida. En general, estos entrenamientos suelen mejorar capacidades de forma específica, es decir, producen mejoras en aquellas tareas que se entrenan pero no en las no entrenadas, y sus efectos son poco mantenidos en el tiempo (Ganz 2005; Mahncke *et al.*, 2006; Milgram *et al.*, 2006). Algunos autores están tratando de modificar estos entrenamientos orientándolos hacia tareas que no se dirijan directamente a capacidades cognitivas superiores, sino a procesos más simples que también se ven afectados por el envejecimiento, como el procesamiento sensorial, que podrían afectar a su vez a las tareas cognitivas superiores (Mahncke *et al.*, 2006). Algunos autores consideran, sin embargo, que alcanzar un método de entrenamiento cognitivo efectivo no es posible, pues es necesario establecer un balance entre los condicionantes genéticos y los ambientales (Ganz 2005). Por este motivo, los trabajos que emplean el modelo de EA en animales están prestando cada vez más atención a los mecanismos epigenéticos que pueden modular las condiciones ambientales y que podrían estar involucrados incluso en procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje (Fischer *et al.*, 2007; Kuzumaki *et al.*, 2010).

El papel protector de los factores ambientales mencionados (y posiblemente otros aún no conocidos) sobre los cambios que acontecen en el cerebro con el envejecimiento se han explicado empleando la hipótesis de la reserva cognitiva. Esta hipótesis propone que existen diferencias individuales en los procesos cognitivos o en las redes neurales que subyacen a la realización de ciertas tareas cognitivas y que permiten a ciertos individuos hacer frente de una forma más eficaz a un daño cerebral (Stern 2009). Los factores que constituyen el origen de esa variabilidad serían genéticos o ambientales. Lo interesante es que, según esta hipótesis, los individuos con altos niveles de educación o que han realizado tareas con alta demanda cognitiva a lo largo de su vida se adaptarían mejor a una situación grave como una lesión cerebral, y no presentarían déficits que sí

presentarían personas que no han tenido esas experiencias a lo largo de su vida (Kramer *et al.*, 2004; Stern 2009). Es decir, los cambios producidos por la experiencia en el cerebro pueden ser anatómicos (por ejemplo, incremento del número de conexiones) o funcionales (reorganización de circuitos). Hay evidencias múltiples y diferentes que indican que la experiencia modifica la estructura y funcionalidad del cerebro humano. Un trabajo ya clásico mostraba que el número de dendritas en el área Wernicke era mayor en aquellas personas que presentaban mayores niveles de educación (Jacobs *et al.*, 1993). Otro trabajo también muy citado mostraba que los taxistas de la ciudad de Londres presentan un hipocampo más desarrollado de lo normal debido a que tienen que elaborar mapas mentales y recordar un gran número de calles para llevar a cabo eficazmente su trabajo y, de hecho, ese volumen se incrementa de forma lineal con los meses de experiencia del taxista (Maguire *et al.*, 2000). También se han visto cambios de actividad en la corteza auditiva y motora en respuesta al entrenamiento musical (Zatorre *et al.*, 2007), o en diversas regiones de cerebro en respuesta a la práctica de un videojuego (Haier *et al.*, 1992). Con respecto al envejecimiento se ha mostrado, tanto en modelos animales como en humanos, que el cerebro aún mantiene cierta plasticidad (Kramer *et al.*, 2004). Por ejemplo, se ha mostrado que un entrenamiento específico durante cinco semanas en personas de más de 60 años mediante el método de los loci (asociar objetos o palabras con lugares de forma mental) produce cambios en la neuroquímica del hipocampo (Valenzuela *et al.*, 2003). Otro trabajo, en el que los individuos debían realizar una tarea dual mostró un incremento en la activación asimétrica de sus lóbulos frontales que se correlacionaba con una mejor realización de la tarea (Erickson *et al.*, 2007).

Existen, sin embargo, algunos problemas relacionados con la interpretación de los resultados en los trabajos que relacionan ciertos factores ambientales con un riesgo reducido de padecer déficits cognitivos asociados a la edad. Por ejemplo, se ha sugerido que el efecto del nivel de educación sobre el riesgo de padecer Alzheimer podía ser explicado por las actividades realizadas durante el tiempo de ocio (Wilson *et al.*, 2002). Los autores sugieren que aquellas personas con niveles de educación más altos dedican generalmente más tiempo a actividades de ocio que requieren una demanda cognitiva alta. Otro problema en estos trabajos, difícilmente evitable, consiste en separar los efectos genéticos de los ambientales. Así, el efecto protector del nivel de educación sobre el riesgo de padecer demencias o sobre un declinar cognitivo temprano, podría ser

explicado por una mayor capacidad cognitiva de esos individuos que consecuentemente les permitiría alcanzar mayores niveles de educación. En relación con esta idea, se ha mostrado que el cociente intelectual a los 11 años de edad podría predecir la aparición de demencias tardías (Whalley *et al.*, 2000). Abundando en esta idea, Sarter y Bruno (Sarter y Bruno 2004) proponen que la presencia de limitaciones cognitivas tempranas originadas, según ellos, por fallos en la maduración del sistema colinérgico, son un mejor predictor de la aparición de enfermedad de Alzheimer, que el nivel de educación o las actividades cognitivas desarrolladas a lo largo de la vida. Por otro lado, algunos autores han mostrado que los efectos de la educación o de las actividades cognitivas se producen sobre la inteligencia cristalizada (la que depende de experiencia, como fluidez verbal o conocimientos generales), pero apenas tendrían efecto sobre la inteligencia fluida (que depende más de la herencia, como la velocidad de respuesta) (Anstey y Chistensen 2000; Milgram *et al.*, 2006).

2.4.El efecto del envejecimiento en la respuesta a estrés en el ser humano.

Con respecto a los cambios en la respuesta a estrés del eje HHA con el envejecimiento, los resultados en humanos aún no son concluyentes. Si bien el modelo que propone la “hipótesis de la cascada de glucocorticoides” (Sapolsky *et al.*, 1986) asume que existe un incremento en los niveles basales de cortisol en los individuos envejecidos, así como una recuperación retrasada de los mismos tras una situación de estrés, los resultados de diversos trabajos podrían no apoyar esta idea. En general, por ejemplo, no suele observarse un incremento con el envejecimiento de los niveles basales de cortisol en humanos (Kudielka *et al.*, 2000; Wolf 2003; Otte *et al.*, 2005; Conrad, 2008). Sin embargo, un trabajo ha sugerido que podrían existir tres subpoblaciones, de modo que una de ellas mostraría incrementos de niveles basales de cortisol con el envejecimiento, otra en la que éstos apenas se verían modificados y otra en la que descenderían (Lupien *et al.*, 1998). Este mismo trabajo muestra, además, que aquellos individuos en los que se incrementan los niveles basales de cortisol con la edad presentan un hipocampo atrófico y déficits en una tarea relacionada con su función, lo que sí apoyaría, al menos en parte, lo propuesto por la hipótesis de la “cascada de glucocorticoides”. Por otro lado, si bien algunos trabajos han mostrado que los individuos envejecidos muestran una mayor respuesta de cortisol a estímulos tanto fisiológicos como farmacológicos (Otte *et al.*, 2005), otros trabajos más centrados en la respuesta a estrés muestran que no hay

cambios en la respuesta de cortisol a estrés con el envejecimiento (Kudielka *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2002). Algunos trabajos sugieren, sin embargo, que el incremento de cortisol, aún siendo el mismo en individuos jóvenes y viejos, podría ejercer efectos diferentes sobre la memoria en unos y otros (Kukolja *et al.*, 2008).

Podría pensarse que los resultados observados en humanos no son tan homogéneos como en roedores, aun cuando no haya una diferencia marcada entre ellos. De hecho, se ha mostrado que aquellas ratas viejas que presentan déficits en memoria espacial presentan a su vez una recuperación retrasada de los niveles de CORT en respuesta a estrés, mientras que aquellas ratas que no presentan esos déficits en memoria espacial presentan una dinámica de CORT en respuesta a estrés similar a la de animales jóvenes (Issa *et al.*, 1990). Además, muchos de los resultados clásicos en este campo se llevaron a cabo con una misma cepa de ratas, que se ha mostrado que difiere de otras cepas que se han empleado posteriormente (Segar *et al.*, 2009), por lo que aún podrían ajustarse más los modelos para encontrar uno más similar al del ser humano. Una cuestión que sí podría plantear más dificultades es el hecho de que los receptores de glucocorticoides, que están expresados en alta densidad en el hipocampo de roedores, parecen, en comparación, presentar menores niveles en humanos, mientras que se expresan en mayor densidad en la CPF. De hecho, en humanos, la memoria de trabajo parece ser más sensible a los glucocorticoides que la memoria episódica, algo que no es tan acusado en roedores (Lupien *et al.*, 2007). Por otro lado, existen condicionantes de la respuesta a estrés que cobran una mayor relevancia en humanos que en roedores. Así, se han mostrado importantes efectos de la jerarquía sobre la respuesta a estrés. Este efecto se ha mostrado tanto en primates (Sapolsky 2005) como en humanos (Hellhammer *et al.*, 1997). Sin embargo, los mecanismos celulares de los glucocorticoides no difieren entre roedores y humanos, por lo que el empleo del roedor como modelo para estudiar los efectos del envejecimiento sobre la actividad del eje HHA parece plenamente justificado.

ACERCA DE LOS RESULTADOS.

Los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran que, a nivel neuroquímico el envejecimiento reduce la respuesta a estrés del sistema dopaminérgico pero no la del colinérgico en la CPF. A nivel conductual, el envejecimiento reduce la actividad motora en un ambiente novedoso y produce déficits tanto en el aprendizaje como en la realización de una prueba de memoria de trabajo. Por otra parte, el envejecimiento no modifica la concentración de CORT libre tanto en la CPF como en el hipocampo en respuesta a estrés.

El EA no modifica los efectos del envejecimiento sobre los parámetros estudiados, pero sí reduce la respuesta a estrés de los sistemas dopaminérgico y colinérgico en la CPF, así como la actividad motora en un ambiente novedoso. Además, el EA reduce la concentración de CORT libre en respuesta a estrés en la CPF de animales jóvenes.

1.Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y liberación de dopamina en la corteza prefrontal.

Como se muestra en la Figura 1, el estrés incrementó la concentración extracelular de dopamina en la CPF. Este mismo resultado ha sido mostrado por varios grupos de investigación empleando diferentes estímulos como agentes estresantes (Thierry *et al.*, 1976; Abercrombie *et al.*, 1989; Finlay *et al.*, 1995; Feenstra *et al.*, 1995; Del Arco y Mora 2001a; Sullivan y Gratton 2002). Se ha sugerido que el incremento de dopamina producido por estrés en la CPF es debido a la activación de las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en el área tegmental ventral y que conforman la vía mesocortical (Thierry *et al.*, 1976; Deutch y Roth 1990). Aunque la función de estos incrementos de dopamina en la CPF en respuesta a estrés no está todavía totalmente definida, se ha sugerido que podrían estar relacionados con una atención y vigilancia incrementadas (Deutch y Roth 1990), con la ansiedad (Finlay *et al.*, 1995), o con la integración de respuestas emocionales y fisiológicas ante situaciones estresantes (Sullivan y Gratton 1998), funciones todas ellas muy relacionadas entre sí. En un intento por aunar estas funciones en un esquema interpretativo, Hains y Arnsten (2008) proponen que los incrementos de dopamina en la CPF en respuesta a estrés inhibirían las eferencias de la CPF, especialmente las que proyectan sobre la amígdala. En tanto

que estas proyecciones prefronto-amigdalinas presentan un papel inhibitor, se ha sugerido que el incremento en la actividad dopaminérgica en la CPF bloquearía esta inhibición permitiendo, por tanto, la activación de la amígdala. Esta activación de la amígdala permitiría la expresión de respuestas más innatas que implican el desarrollo de conductas de adaptación a la situación de estrés como la huida o el miedo.

El envejecimiento redujo la liberación de dopamina en respuesta a estrés en la CPF. Este resultado ya se había mostrado en un trabajo previo (Del Arco *et al.*, 2001a). También se ha mostrado, mediante microdiálisis, una menor liberación de dopamina en la CPF de ratas viejas en respuesta a altas concentraciones de potasio en el LCRs (Segovia *et al.*, 2008; Mizoguchi *et al.*, 2009b). Además, se ha descrito una menor densidad de fibras dopaminérgicas en la CPF tanto de ratas como de gerbos envejecidos (Brummelte y Teuchert-Noodt 2007; Mizoguchi *et al.*, 2009b). Estas evidencias apoyarían la idea de una liberación reducida de dopamina en respuesta a estrés en la CPF, ya fuese ésta producida por una menor densidad de terminaciones nerviosas en esta área cerebral, o por una menor reactividad de las mismas al estímulo estresante. Esta menor respuesta del sistema dopaminérgico mesocortical en los animales envejecidos podría indicar un declive en funciones relacionadas con la CPF que dependan de niveles óptimos de dopamina en ésta, como la memoria de trabajo. De hecho, como se muestra en la Tabla 6, los animales viejos mostraron déficits en la memoria de trabajo al compararlos con los animales jóvenes. Sin embargo, aunque el sistema dopaminérgico mesocortical presenta alteraciones en su función, no se puede hablar de una pérdida de neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral, ya que ni el número de neuronas marcadas para tirosina hidroxilasa, ni la actividad de esta enzima se ven modificadas con la edad (Emerich *et al.*, 1993; Martín *et al.*, 2008; Mizoguchi *et al.*, 2009b). Esto último apoyaría el hecho de que el envejecimiento no modifique los niveles basales de dopamina en la CPF (ver Tabla 1). Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos previos que muestran que la concentración basal de dopamina en la CPF o en la corteza frontal no se ve modificada en animales envejecidos (Goudsmit *et al.*, 1990; Godefroy *et al.*, 1991; Tanila *et al.*, 1994; Míguez *et al.*, 1999). Otros trabajos, sin embargo, han mostrado una caída en estos niveles con la edad (Luine *et al.*, 1990; Del Arco *et al.*, 2001a; Miura *et al.*, 2002). Diferentes metodologías, cepa de los animales o edades de los grupos escogidos podrían explicar estas discrepancias en los resultados. En resumen, los resultados muestran que el envejecimiento reduce la

capacidad del sistema dopaminérgico mesocortical para responder a una situación de estrés, pero no modifica la liberación basal del sistema.

El EA a lo largo de toda la vida del animal no modificó la tendencia observada durante el envejecimiento sobre los incrementos de dopamina en respuesta a estrés. Estos resultados sugieren que el EA no atenúa la reducción que el envejecimiento produce sobre la actividad del sistema dopaminérgico mesocortical en respuesta a estrés. Sin embargo, los incrementos de dopamina producidos por estrés fueron menores en los animales mantenidos en EA que en los animales controles (ver Figura 2). Esta menor respuesta del sistema dopaminérgico mesocortical en los animales mantenidos en EA podría dar lugar a una mejor capacidad de estos animales para hacer frente al estrés y, por tanto, en una atenuación en sus respuestas relativas a la activación del estado de alerta o a la ansiedad, en comparación con los animales control. De hecho, se ha propuesto que una menor liberación de dopamina en la CPF en respuesta a estrés podría tener que ver con la percepción de controlabilidad del mismo (Carlson *et al.*, 1993; Berridge *et al.*, 1999; Bland *et al.*, 2003). Por otro lado, el EA no modificó la concentración extracelular de dopamina en la CPF. Este resultado está de acuerdo con otros que no mostraron cambios en el contenido de dopamina ni de sus metabolitos en la corteza frontal de ratones mantenidos en EA (Naka *et al.*, 2002). Otros trabajos, sin embargo, han mostrado una menor densidad y función del transportador de dopamina en la CPF de animales mantenidos en condiciones de EA (Zhu *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005), lo que sugeriría mayores niveles de dopamina en el espacio extracelular de esta área cerebral. Sin embargo, en estos trabajos no se evaluó la concentración de dopamina en la CPF, y además no se conoce el nivel de actividad de la enzima MAO en los animales mantenidos en EA en la CPF, que podría compensar la menor densidad de transportadores observada en estos animales.

Una hipótesis para explicar las diferencias observadas en el incremento de dopamina en respuesta a estrés en la CPF entre animales mantenidos en EA y controles podrían venir dada, por las conexiones recíprocas de la CPF sobre el área tegmental ventral, que sinapsarían sobre neuronas GABA de esta área (Sesack y Pickel 1992; Carr y Sesack 2000). Una mayor actividad de la CPF en respuesta a estrés en los animales mantenidos en EA daría lugar a una mayor inhibición sobre el área tegmental ventral, que conllevaría menores incrementos de dopamina en la CPF en los animales mantenidos en

EA. De hecho, se ha mostrado que mayores niveles de activación de la CPF dan lugar a menores respuestas de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en la CPF en respuesta a estrés (Bland *et al.*, 2003; Amat *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2006; Stalnaker *et al.*, 2009) (para una discusión más detallada ver las Consideraciones finales acerca de los efectos del EA sobre la respuesta a estrés).

2. Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y liberación de acetilcolina en la corteza prefrontal.

El estrés incrementó de forma significativa los niveles de acetilcolina en la CPF en los animales de todas las edades estudiadas (Figura 3). Trabajos previos empleando la técnica de microdiálisis han mostrado un incremento de los niveles de acetilcolina en respuesta a distintos tipos de estrés en la CPF (Rosenblad y Nilsson 1993; Mark *et al.*, 1996; Dazzi *et al.*, 2001b; Laplante *et al.*, 2004), corteza frontal (Thiel *et al.*, 1998) y áreas relacionadas con éstas, como el hipocampo (Imperato *et al.*, 1989; Imperato *et al.*, 1991; Mark *et al.*, 1996; Acquas *et al.*, 1996; Giovannini *et al.*, 1998) o el núcleo accumbens (Thiel *et al.*, 1998). La presentación de un objeto novedoso o de diferentes estímulos sensoriales también incrementan la liberación de acetilcolina en el hipocampo (Inglis y Fibiger 1995; Acquas *et al.*, 1996). Se ha sugerido que los incrementos de acetilcolina en la CPF en respuesta a estrés se deben principalmente a la activación de neuronas colinérgicas presentes en el núcleo basal magnocelular (Kurosawa *et al.*, 1989a; Rosenblad y Nilsson 1993; Jacobson *et al.*, 2008). Estos incrementos podrían tener que ver con funciones relacionadas entre sí, como son la modulación de la atención selectiva (Dalley *et al.*, 2004; Sarter *et al.*, 2005) o la respuesta de activación (*arousal*) ante la presentación de ambientes y estímulos novedosos (Inglis y Fibiger 1995; Mark *et al.*, 1996; Acquas *et al.*, 1996; Thiel *et al.*, 1998; Thiel *et al.*, 1999).

El envejecimiento no modificó los incrementos de acetilcolina producidos por estrés en la CPF (Figura 4). Fischer *et al.*, (1991) obtuvieron resultados similares en el hipocampo. Además, otros trabajos han mostrado que la liberación de acetilcolina en varias áreas cerebrales en respuesta a diversos estímulos farmacológicos, eléctricos o ambientales no es modificada por el envejecimiento (Kurosawa *et al.*, 1989b; Fischer *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1996; Herzog *et al.*, 2003). Estos resultados

sugieren, por tanto, que el envejecimiento no modifica la capacidad del sistema colinérgico para responder a estímulos estresantes.

Los resultados obtenidos son interesantes en el contexto de la “hipótesis colinérgica” (Bartus *et al.*, 1982), que hacía suponer una disfunción en el sistema colinérgico en los animales viejos. Esta disfunción no se ve reflejada en la liberación de acetilcolina inducida por estímulos de diversa naturaleza, como se ha mencionado más arriba. De hecho, existen evidencias experimentales que sugieren que el número de neuronas colinérgicas no se ve reducido de forma importante durante el envejecimiento (Decker 1987; Sarter y Bruno 1998), lo que apoyaría el hecho de que la liberación estimulada de acetilcolina por estrés no varíe significativamente con la edad. Sin embargo, no se puede descartar que exista algún cambio en la actividad del sistema colinérgico que pueda explicar, al menos en parte, los déficits cognitivos asociados a la edad. En primer lugar, los menores niveles basales de acetilcolina observados en los animales viejos en el presente trabajo podrían explicar en parte esos déficits. Así, el envejecimiento redujo las concentraciones basales de acetilcolina en la CPF (Tabla 2). Un trabajo previo mostró este mismo resultado (Segovia y Mora 2005), si bien otros resultados no muestran diferencias entre animales jóvenes y viejos en este parámetro en corteza frontal (Moore *et al.*, 1996) o frontoparietal (Moore *et al.*, 1992; Herzog *et al.*, 2003). En segundo lugar, diversos trabajos han mostrado algunos resultados que estarían en línea con los obtenidos en la presente Tesis Doctoral, como son una reducción en la densidad de receptores muscarínicos, o de células marcadas para colina-acetil-transferasa (Strong *et al.*, 1986; Decker 1987; Fischer *et al.*, 1992; Bartus 2000; Stemmelin *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que los efectos de la acetilcolina, tanto a nivel pre- como postsináptico podrían estar comprometidos, estando de ese modo alterada la funcionalidad de los circuitos en los que interviene la transmisión colinérgica. Por último, se ha mostrado que el envejecimiento reduce la liberación de acetilcolina en la corteza frontal producida por altas concentraciones de potasio y calcio en el LCRs (Moore *et al.*, 1996; Herzog *et al.*, 2003), si bien se ha sugerido que esta respuesta reducida no sería debida a una menor capacidad de liberación de las terminaciones colinérgicas en los animales viejos, sino a posibles cambios en otros sistemas de neurotransmisión (Moore *et al.*, 1996).

El EA no modificó el patrón de incrementos de acetilcolina en respuesta a estrés en la CPF producido a lo largo del envejecimiento. Esto sugiere que el EA no modifica la tendencia observada durante el envejecimiento sobre esta respuesta. Sin embargo, el EA, redujo de forma significativa los incrementos de acetilcolina producidos por estrés en la CPF, de modo que los animales de 15 y 24 meses mantenidos en condiciones de EA mostraron menores incrementos de acetilcolina, y se observó una tendencia no significativa en el caso de los animales de 6 meses (Figura 4). No había hasta el momento trabajos que hubiesen estudiado el efecto del EA sobre la respuesta colinérgica a estrés en la CPF. Las implicaciones funcionales que puede tener una menor actividad colinérgica en respuesta al estrés podrían tener relación con los procesos atencionales y de activación de los animales en respuesta al estímulo estresante (Acquas *et al.*, 1996; Robbins 1997; Sarter y Bruno 2000; Sarter *et al.*, 2005). Es posible que el estímulo estresante conlleve una menor demanda de atención en los animales mantenidos en condiciones de EA y que están más acostumbrados a hacer frente a breves episodios de estrés debido a la mayor interacción social o a los cambios frecuentes en su ambiente (Fox *et al.*, 2006). En contraste con esta menor liberación de acetilcolina en respuesta a estrés, el EA no modificó los niveles basales de acetilcolina en la CPF. Otros trabajos han evaluado los niveles de las enzimas acetilcolinesterasa y colina-acetil-transferasa, pero los resultados muestran ciertas discrepancias. Así, algunos trabajos han mostrado que el EA incrementa (Rosenzweig y Bennett 1996) la expresión y actividad de estas enzimas, otros trabajos han mostrado que estos efectos sólo se alcanzan tras un entrenamiento cognitivo de las ratas (Park *et al.*, 1992), o que éstos ni siquiera se obtienen con el entrenamiento (Myhrer *et al.*, 1992). En conjunto, estos datos sugieren que el EA no modifica de actividad basal del sistema colinérgico en la CPF.

Hasta la fecha, no están claros todavía cuáles son los mecanismos que modulan la actividad del sistema colinérgico en la CPF. Una posible explicación para la menor liberación de acetilcolina en respuesta a estrés de los animales mantenidos en EA, podría tener que ver con la interacción entre dopamina y acetilcolina que se establece en la CPF. Así, la inyección sistémica de agonistas dopaminérgicos produce incrementos de acetilcolina en la CPF (Steele *et al.*, 1997; Day *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 2000). Además, en un trabajo previo se ha mostrado que la perfusión local en la CPF de SKF38393 (agonista de los receptores D1 de dopamina) produce una menor liberación

de acetilcolina en esta misma área cerebral en animales de 6 meses mantenidos en EA que en condiciones control (Del Arco *et al.*, 2007a). Además en ese mismo trabajo se ha mostrado que la densidad de receptores D1 es menor en la CPF de animales mantenidos en EA. Dado que el estrés incrementa la concentración de dopamina en la CPF, tanto de animales mantenidos en EA como controles, es posible que la menor liberación de acetilcolina producida por estrés en los primeros fuese debida, al menos en parte, a la menor densidad de receptores D1 presentes en la CPF. Existen datos, sin embargo, en contra de esta hipótesis. Por ejemplo, en un trabajo en nuestro laboratorio no hemos observado esta diferencia en la liberación de acetilcolina en la CPF en respuesta a la perfusión de SKF38393 en animales de 15 y 24 meses de edad, mientras que la liberación de dopamina sí que era diferente en respuesta a estrés (datos no publicados). Además, Laplante *et al.*, (2004) estudiaron esta hipótesis específicamente y observaron que la perfusión en la CPF de un antagonista de los receptores D1 de dopamina no modifica los incrementos de acetilcolina producidos por estrés en esta misma área, algo que hemos reproducido recientemente en nuestro laboratorio (artículo en preparación).

Por último, al igual que en el caso de la dopamina, otra hipótesis alternativa para explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo podría residir en una diferencia en la actividad de la CPF y su posible papel inhibitor sobre la actividad de las neuronas colinérgicas del núcleo basal magnocelular, mediante conexiones recíprocas que sinapsarían sobre neuronas GABA situadas en esa misma área cerebral. La diferencia en la magnitud de la actividad de la CPF vendría determinada por la distinta percepción del estrés de los animales mantenidos en EA frente a los mantenidos en condiciones control. Esta hipótesis se desarrolla de forma pormenorizada y conjuntamente con los datos obtenidos para la dopamina en las Consideraciones finales acerca de los efectos del EA sobre la respuesta a estrés).

3.Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y concentraciones extracelulares de glutamato en la corteza prefrontal.

El estrés no modificó de forma significativa la concentración extracelular de glutamato en la CPF en ninguno de los grupos experimentales (Figura 5). Estos resultados se corresponden con otros trabajos anteriores (Timmerman *et al.*, 1999; Del Arco y Mora 2001b). Sin embargo, otros trabajos han mostrado que el estrés incrementa la

concentración extracelular de glutamato en la CPF y el hipocampo (Moghaddam 1993; Bagley y Moghaddam 1997). Las diferencias entre los resultados mostrados en el presente trabajo y los de esos otros grupos podrían explicarse por la diferente metodología empleada, especialmente en lo referente al momento en el que se implantan las cánulas de microdiálisis. En nuestro trabajo las cánulas se implantaron 6-7 días tras la cirugía, lo que permite que los animales se recuperen adecuadamente de ésta. En el caso de los trabajos del grupo de Moghaddam, los animales fueron sometidos a estrés 24 horas tras la cirugía, lo que podría alterar la respuesta del sistema glutamatérgico. Añadido a ello la implantación de la sonda de microdiálisis un día antes de llevar cabo el experimento podría dar lugar a un incremento de la gliogénesis que, pudiera, en parte, explicar las diferencias entre sus resultados y los obtenidos en el presente trabajo. Esto no significa que no haya cambios en la transmisión glutamatérgica en la respuesta a estrés en la CPF. Es posible, de hecho, que estos cambios en la transmisión sináptica glutamatérgica no sean detectados por la cánula de microdiálisis (Del Arco *et al.*, 2003; ver Discusión de Métodos). Recientemente, sin embargo, un trabajo ha mostrado *in vitro* que el estrés no produce un incremento de la liberación de glutamato en la CPF pero sí daría lugar a cambios en las respuestas de los receptores AMPA y NMDA de glutamato en esta misma área cerebral, que serían mediados por CORT (Yuen *et al.*, 2009).

Por otro lado, a pesar de que se han descrito algunos cambios producidos por el envejecimiento sobre la respuesta del sistema glutamatérgico a diversos estímulos despolarizantes en la CPF (Cobo *et al.*, 1993; Segovia *et al.*, 2001), en el presente trabajo no se han observado cambios con el envejecimiento en la respuesta a estrés de este sistema. Además, el envejecimiento no modificó los niveles basales de glutamato en la CPF (Tabla 3). Diferentes trabajos han mostrado este mismo resultado tanto en la CPF (Cobo *et al.*, 1993; Segovia y Mora 2005), como en el hipocampo (Segovia *et al.*, 2006). Para una revisión amplia, consultar Segovia *et al.*, 2001).

El envejecimiento no modificó la respuesta a estrés del sistema glutamatérgico en la CPF, y el EA no alteró este patrón.

El EA tampoco modificó la concentración extracelular basal de glutamato en la CPF (Tabla 3). Un trabajo previo mostró que el EA incrementa los niveles basales de

glutamato en animales viejos (Segovia *et al.*, 2006), si bien estos experimentos fueron realizados en el hipocampo, por lo que su diferente estructura anatómica y neuroquímica con respecto a la CPF podría dar lugar a las diferencias observadas entre ambas áreas cerebrales. Por otro lado, diferentes estudios han mostrado cambios en la expresión de receptores glutamatérgicos en el cerebro de animales mantenidos en EA (Gagné *et al.*, 1998; Melendez *et al.*, 2004; Mlynarik *et al.*, 2004; Andin *et al.*, 2007), si bien ninguno de ellos se ha centrado en los efectos del EA sobre estos parámetros durante el envejecimiento. Estos cambios, sin embargo, se ha mostrado que podrían explicar algunos de los cambios conductuales que se observan en los animales mantenidos en EA, incluso aunque, como se muestra en el presente trabajo, no se detecten cambios en la liberación de glutamato (Rampon *et al.*, 2000a; Tang *et al.*, 2001).

4. Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y actividad motora espontánea.

La actividad motora espontánea en un ambiente novedoso se ha sugerido que podría ser un índice de la reactividad del animal a una situación de estrés (Igarashi y Takeshita 1995; Thiel *et al.*, 1999; Giovannini *et al.*, 2001). Pero además la actividad motora es un índice de exploración, que da una idea de la habituación del animal al ambiente novedoso al que ha sido expuesto (Zimmermann *et al.*, 2001; Schildein *et al.*, 2002; Brenes *et al.*, 2008), de modo que una exploración más eficaz del ambiente daría lugar a una más rápida habituación al mismo. El perfil temporal típico de la actividad motora espontánea en un campo abierto de animales jóvenes es el que se muestra en la sección de resultados de la presente Tesis Doctoral. En todos los casos los animales comienzan desplegando unos niveles de actividad motora que decaen con el tiempo (habituación) hasta estabilizarse (Figuras 6 y 8). Este fenómeno se observa tanto en la actividad motora horizontal como vertical.

El envejecimiento redujo la actividad motora espontánea en un ambiente novedoso (Figuras 7 y 9). Estos resultados han sido mostrados por muchos otros trabajos, en los que se sugiere que esta reducción de la actividad motora con la edad podría ser consecuencia de un proceso análogo a la bradiquinesia observada en humanos (Nyakas *et al.*, 1992; Emerich *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1995; Crawford y Levine 1997; Hebert y Gerhardt 1997; Rowe *et al.*, 1998; Shoji y Mizoguchi 2010). No se han estudiado con

detalle, sin embargo, las causas de dicha caída de la actividad motora espontánea asociada al envejecimiento, aunque podría estar relacionada con cambios en la estructura y neuroquímica del estriado, especialmente en el neurotransmisor dopamina (Emerich *et al.*, 1993). Con relación a la neuroquímica de la CPF, la transmisión colinérgica en esta área cerebral ha sido relacionada con la actividad motora. De hecho, el comportamiento exploratorio, ya sea en un campo abierto (Day *et al.*, 1991; Giovannini *et al.*, 1998; Thiel *et al.*, 1998) o ante la presentación de un objeto novedoso (Giovannini *et al.*, 1998; Degroot *et al.*, 2004) se ha relacionado con un aumento de la concentración extracelular de acetilcolina en la CPF, corteza frontal e hipocampo. Además, algunos trabajos han mostrado una correlación positiva entre los niveles de acetilcolina en la CPF y la actividad motora (Day *et al.*, 1991; Mitsushima *et al.*, 1996; Giovannini *et al.*, 2001). Sin embargo, no parece que la concentración de acetilcolina en la CPF pueda explicar los resultados obtenidos, puesto que, como se ha mostrado en este trabajo, mientras que el envejecimiento reduce la actividad motora en un ambiente novedoso, éste no modifica los incrementos de acetilcolina en respuesta a estrés en la CPF. Otra posibilidad para explicar estos resultados sería una diferente sensibilidad a los glucocorticoides. Se ha relacionado a los receptores de mineralocorticoides con la exploración de un ambiente novedoso (Oitzl *et al.*, 1994). Una reducción en la expresión de receptores de mineralocorticoides en el cerebro de los animales viejos podría explicar, al menos en parte, los menores niveles de actividad motora de éstos (Issa *et al.*, 1990; Hassan *et al.*, 1999; Hibberd *et al.*, 2000). Por último, otra hipótesis propuesta, aunque más especulativa, es que la menor actividad motora de los animales reflejaría una menor motivación por explorar los estímulos novedosos, lo que implicaría una alteración en los circuitos límbicos con el envejecimiento (Salchner *et al.*, 2004; Hunt *et al.*, 2009).

El EA no modificó la tendencia negativa observada sobre la actividad motora durante el envejecimiento, lo que sugiere que los cambios que subyacen a estos déficits, ya sean de tipo muscular, o relacionados con ciertos parámetros neuroquímicos u hormonales, no se ven atenuados por el EA. Sin embargo, el EA redujo la actividad motora en un ambiente novedoso tanto en los animales de 6 como de 15 meses de edad. Diversos trabajos han mostrado este mismo resultado, aunque siempre en animales jóvenes (Varty *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2001; Schrijver *et al.*, 2002; Larsson *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2003; Elliott y Grunberg 2005; Brenes *et al.*, 2008). Estas diferencias

en la actividad motora total se deben, como puede observarse en las Figuras 6 y 8, a una habituación más rápida de los animales mantenidos en EA que los animales control. Se ha sugerido que esta más rápida habituación de los animales enriquecidos podría deberse a una mayor capacidad exploratoria proporcionada por sus condiciones de vida habituales, que permiten a estos animales mayores oportunidades para explorar el ambiente (Iuvone *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 2001; Larsson *et al.*, 2002). Además, otros trabajos han mostrado que el comportamiento exploratorio evaluado mediante una prueba de reconocimiento de objetos parece seguir el mismo patrón que la actividad motora, de modo que los animales enriquecidos exploran inicialmente más los objetos nuevos, pero el tiempo total dedicado a la exploración es menor que el empleado por los animales controles (Myhrer *et al.*, 1992; Zimmermann *et al.*, 2001; Schrijver *et al.*, 2002). Otro aspecto interesante de estos resultados es que en los animales de 6 meses existe una tendencia no significativa a que durante los primeros 5 minutos de exposición al campo abierto los animales mantenidos en EA muestren mayores niveles de actividad motora, que reflejarían la mayor eficacia exploratoria de estos animales. Esta misma tendencia se ha observado en otros trabajos (Zimmermann *et al.*, 2001; Larsson *et al.*, 2002; Elliott y Grunberg 2005). Por tanto, estos resultados avalarían una diferencia en capacidad exploratoria producida por las diferentes condiciones ambientales a las que fueron expuestos los animales.

Aunque hay un cierto acuerdo en cuanto a que la capacidad de exploración explicaría los menores niveles de actividad motora en los animales mantenidos en EA, no se han estudiado, sin embargo, los mecanismos neuroquímicos por los cuales el EA reduce la actividad motora. Por un lado, como se ha mencionado arriba, algunos trabajos han mostrado una relación entre los niveles de acetilcolina en la CPF y la actividad motora (Day *et al.*, 1991; Giovannini *et al.*, 1998; Thiel *et al.*, 1998). Las diferencias observadas en la actividad motora entre ambos grupos podrían ser debidas, al menos en parte, a la distinta activación observada en el sistema colinérgico en la CPF en respuesta a estrés que se muestra en este mismo trabajo. Sin embargo, algunos autores han sugerido que los incrementos de acetilcolina en respuesta a la actividad motora podrían reflejar la activación de procesos atencionales o de activación (*arousal*), que no tendrían que ver directamente con la actividad motora y que podrían ser incluso una consecuencia de la misma (Thiel *et al.*, 1998; Pepeu y Giovannini 2004). Además, no todos los trabajos han

mostrado una correlación positiva entre los niveles de acetilcolina en la CPF y la actividad motora (Giovannini *et al.*, 2001).

Una explicación alternativa a la menor actividad motora mostrada por los animales mantenidos en EA en el campo abierto podría venir dada por la liberación de CORT en respuesta a la exposición de los animales a un ambiente novedoso. Se ha observado un incremento de los niveles de CORT en respuesta a la introducción de los animales en un campo abierto (Bats *et al.*, 2001). Además, se ha descrito un incremento rápido de la actividad motora tras la inyección intraperitoneal de CORT (Sandi *et al.*, 1996). Es posible, por tanto, que los cambios en la densidad de receptores de glucocorticoides en el hipocampo de animales mantenidos en EA (Olsson *et al.*, 1994; Dahlgvist *et al.*, 1999) así como la menor liberación de CORT de estos animales en respuesta a estrés, que se muestra en esta misma Tesis Doctoral (ver más adelante), pudieran dar lugar a las diferencias observadas en la actividad motora entre ambos grupos experimentales. Un papel importante en estas diferencias podría jugarlo también una expresión diferencial de los receptores de mineralocorticoides que, como ya se ha mencionado, se ha sugerido que podrían regular la exploración de un ambiente novedoso (Oitzl *et al.*, 1994).

5. Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y memoria de trabajo.

La evaluación de la memoria de trabajo es indicativa de la función de la CPF (Baddeley 1992; Fuster 2000; Robbins y Roberts 2007), y más concretamente del sistema dopaminérgico en esta área cerebral, pues diversos trabajos le han atribuido un papel importante en la regulación de esta función (Goldman-Rakic 1995; Arnsten y Li 2005; Williams y Castner 2006; Robbins y Roberts 2007). Se pueden emplear diversas pruebas para evaluar la tarea de trabajo. En el presente trabajo se ha empleado el laberinto acuático en forma de T empleando un protocolo modificado del empleado por Aultman y Moghaddam (2001). Los animales son capaces de aprender esta prueba de alternancia retrasada y alcanzan unos niveles relativamente estables de desarrollo de la misma en días sucesivos (ver Figura 10).

El estrés (10 minutos en un campo abierto iluminado) redujo de forma significativa el porcentaje de aciertos de los animales en la realización de la prueba del laberinto

acuático en forma de T en los animales de 6 y 15 meses, pero no en los de 24 meses (Figura 11). Otros trabajos han mostrado este mismo resultado empleando otras pruebas que requieren memoria de trabajo tanto en roedores como en monos (Murphy *et al.*, 1996; Zahrt *et al.*, 1997; Arnsten y Goldman-Rakic 1998; Williams y Castner 2006). Como ya se ha mencionado, diferentes estudios han mostrado que la dopamina en la CPF juega un papel importante, tanto en roedores, como en monos y humanos, en el mantenimiento de la memoria de trabajo (Brozoski *et al.*, 1979; Romanides *et al.*, 1999; Aultman y Moghaddam 2001; Phillips *et al.*, 2004; Chudasama y Robbins 2004). En particular, parece ser importante la unión de la dopamina con sus receptores D1 (Goldman-Rakic *et al.*, 2000; Aultman y Moghaddam 2001; Mizoguchi *et al.*, 2004). Así, se ha sugerido que el efecto negativo del estrés sobre la memoria de trabajo es debido al incremento de dopamina producido por el estrés en la CPF, como el que se muestra en esta misma Tesis Doctoral (Figura 1), y que produciría una activación de los receptores D1 prefrontales por encima de los niveles óptimos que aseguran un adecuado funcionamiento (Williams y Castner 2006). En apoyo de esta hipótesis, se ha mostrado un incremento de dopamina en la CPF en respuesta a la exposición a un campo abierto (Beaufour *et al.*, 2001) que podría explicar el efecto negativo del estrés sobre la memoria de trabajo observado en el presente trabajo. Además, se ha mostrado que este efecto puede ser revertido mediante la inyección local de antagonistas D1 en la CPF (Murphy *et al.*, 1996; Arnsten y Goldman-Rakic 1998). Sin embargo, no puede descartarse la participación de otros neurotransmisores en el efecto del estrés sobre la memoria de trabajo (Rossetti y Carboni 2005; Ramos y Arnsten 2007). Es importante señalar además que el efecto del estrés agudo sobre la memoria de trabajo fue transitorio, puesto que el día siguiente a la exposición al estrés los animales volvieron a realizar la tarea con el nivel de aciertos habitual (Figura 10).

Sin embargo, en los animales de 24 meses no se observó un efecto significativo del estrés sobre la memoria de trabajo, pero el porcentaje de aciertos en esas condiciones no fue diferente del alcanzado por los animales de 6 ó 15 meses. Por tanto, no puede afirmarse que exista una sensibilidad diferente al estrés con la edad, al menos en lo que respecta a su efecto sobre la memoria de trabajo.

Los resultados muestran que el envejecimiento afectó de forma negativa al aprendizaje y realización de la tarea. De hecho, el envejecimiento incrementó el número de días

necesarios para alcanzar el criterio de aprendizaje y redujo el porcentaje de aciertos empleando intervalos de retención de 10 y 100s (Tablas 4 y 5). Estos resultados están de acuerdo con otros que sugieren que el envejecimiento reduce la memoria de trabajo (Cai y Arnsten 1997;Castner y Goldman-Rakic 2004;Shukitt-Hale *et al.*, 2004;Mizoguchi *et al.*, 2009b). Se ha sugerido que una activación reducida de los receptores D1 de dopamina en la CPF podría ser la responsable de estos déficits y, de hecho, éstos son revertidos, al menos en parte, mediante la inyección local de agonistas de los receptores D1, tanto en ratas como en monos (Cai y Arnsten 1997;Castner y Goldman-Rakic 2004;Mizoguchi *et al.*, 2009b). Los resultados de los experimentos de microdiálisis del presente trabajo no mostraron, sin embargo, diferencias en los niveles basales de dopamina en la CPF entre animales jóvenes y viejos, por lo que no parece ser la concentración extracelular de dopamina la que explique estas diferencias. Por otro lado, se ha mostrado que los animales envejecidos muestran una menor expresión de receptores D1 prefrontales (Backman *et al.*, 2006) y una menor respuesta electrofisiológica a agonistas D1 (Parfitt *et al.*, 1990), por lo que es posible que factores postsinápticos, más que la liberación de dopamina, pudiesen explicar los déficits observados en los animales viejos.

El EA no modificó el efecto del envejecimiento sobre la realización de la tarea a ninguno de los dos intervalos de retención, ni en condiciones de estrés. Por tanto, el EA no modifica los déficits asociados a la edad observados tanto en el aprendizaje como en la memoria de trabajo evaluados mediante la realización de un laberinto acuático en forma de T.

El EA, además, no modificó ni la realización de la prueba en condiciones basales, ni el efecto del estrés sobre la misma. Diferentes estudios han mostrado que animales jóvenes y viejos mantenidos en condiciones de EA muestran una mayor memoria de trabajo espacial evaluada en diversas pruebas (laberinto radial, reconocimiento de objetos, laberinto acuático) en comparación con animales en condiciones estándar o de aislamiento (Pacteau *et al.*, 1989;Leggio *et al.*, 2005;Lores-Arnaiz *et al.*, 2006;Leal-Galicia *et al.*, 2008). El único estudio que ha evaluado a animales mantenidos en condiciones de EA en un laberinto en T (no acuático) con intervalos de retención similares a los empleados en la presente Tesis Doctoral mostró un efecto débil del EA sobre la memoria de trabajo de animales mantenidos en esas condiciones desde su

período peripuberal (Melendez *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que el EA puede tener un efecto positivo sobre la memoria espacial pero no sobre la memoria de trabajo, dependiente de la CPF. Es interesante que otros estudios han mostrado cambios en el hipocampo producidos por el EA (neurogénesis, expresión de factores neurotróficos, potenciación a largo plazo incrementada, etc), que podrían explicar estos cambios en la memoria espacial y no en la memoria de trabajo.

6. Envejecimiento, enriquecimiento ambiental y corticosterona en plasma y cerebro.

6.1. Envejecimiento y corticosterona.

El papel, tanto de los niveles basales de CORT como producidos por estrés es importante en el contexto de las llamadas “hipótesis de la neurotoxocidad” (Montaron *et al.*, 2006; Conrad 2008; Lupien *et al.*, 2009), e “hipótesis de la cascada de glucocorticoides” (Sapolsky *et al.*, 1986). Estas hipótesis proponen que la exposición a concentraciones elevadas de CORT de forma continuada puede favorecer la acción de otros agentes neurotóxicos sobre ciertas áreas cerebrales, que darían lugar a los déficits cognitivos asociados a la edad, así como a otras enfermedades psiquiátricas que podrían depender de una disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Lupien *et al.*, 2009). Si bien “la hipótesis de la cascada de glucocorticoides” no diferencia claramente el papel que juegan los niveles de CORT basales o estimulados por estrés, la “hipótesis de la neurotoxocidad” atribuye un papel más importante a los niveles basales de CORT elevados y mantenidos en el tiempo en los cambios observados durante el envejecimiento.

6.1.1. Corticosterona plasmática.

Los resultados del presente trabajo de investigación muestran que el envejecimiento no modificó los niveles basales de CORT plasmática (Figura 14). Los resultados a este respecto son contradictorios en la bibliografía. Mientras que algunos trabajos muestran que los animales viejos presentan mayores niveles de CORT plasmática (Montaron *et al.*, 2006; Lupien *et al.*, 2009), otros no han mostrado diferencias (Yau *et al.*, 1994; Meijer *et al.*, 2005; Segar *et al.*, 2009; Shoji y Mizoguchi, 2010). Estas

discrepancias pueden ser debidas a las distintas cepas de los animales empleados o a la hora del día en la que fueron tomadas las muestras. Por tanto, los datos del presente trabajo no apoyarían la idea de mayores niveles basales de CORT plasmática con la edad.

6.1.2. Corticosterona libre en el cerebro.

Con respecto al estudio de la CORT libre en la CPF, es importante señalar que el empleo de la microdiálisis permite evaluar *in vivo* y directamente en el cerebro las concentraciones de hormona “útil”, es decir, la que tiene posibilidad de unirse a sus receptores en el cerebro. Además, este trabajo es el primero que ha evaluado las concentraciones de CORT libre tanto en condiciones basales como inducidas por estrés en animales viejos, lo que es relevante en el contexto de la “hipótesis de la cascada de glucocorticoides”, pues ésta asume que los mayores niveles plasmáticos de CORT observados en animales viejos se reflejarán en el cerebro y por tanto, darán lugar a un daño diferencial sobre éste.

El estrés incrementó los niveles de CORT libre en la CPF en todos los grupos de edad. Este mismo resultado ha sido mostrado por otros grupos de investigación mediante el empleo de la técnica de microdiálisis, tanto en CPF como en hipocampo (Linthorst *et al.*, 2000; Kitchener *et al.*, 2004; Droste *et al.*, 2007; Droste *et al.*, 2009a). Estos incrementos de CORT en la CPF producidos por estrés son el resultado de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, que conduce a la liberación de CORT desde las glándulas adrenales. Una gran parte de esta CORT se une a proteínas transportadoras, mientras que la fracción libre alcanza el cerebro tras atravesar la barrera hematoencefálica (Herbert *et al.*, 2006). La CORT, en el cerebro, participa tanto en la regulación del eje HHA como en la modulación de circuitos cerebrales implicados en la adaptación a la situación de estrés (Herman *et al.*, 2005).

Los resultados (Figura 13) muestran que el envejecimiento no modificó el incremento de CORT libre producido por estrés en la CPF. Estos resultados contrastan con la idea generalizada de que los animales viejos muestran mayores incrementos de CORT en respuesta a estrés que los jóvenes (Sapolsky *et al.*, 1984; Lorens *et al.*, 1990; Issa *et al.*, 1990; van Eekelen *et al.*, 1992; Segar *et al.*, 2009). Sin embargo, existe un matiz

importante en esta afirmación, y es que todos los trabajos citados han evaluado la CORT en plasma, y habitualmente se asume que los niveles cerebrales de CORT son un reflejo de los niveles de CORT plasmática. La “hipótesis de la cascada de glucocorticoides” de Sapolsky *et al.* (1986) atribuye un papel importante al incremento diferencial de CORT plasmática entre animales jóvenes y viejos sobre los déficits cognitivos asociados a la edad, causados por las alteraciones que producirían los mayores incrementos de CORT libre en el cerebro sobre áreas relacionadas con la cognición, como la CPF y el hipocampo. Esta hipótesis, basada en datos obtenidos exclusivamente en plasma no había evaluado el incremento de CORT directamente en el cerebro de animales viejos en respuesta a estrés. Dado que, como muestra el presente trabajo, estos incrementos no son diferentes en los animales viejos frente a los jóvenes, es posible que la idea de la “cascada de glucocorticoides” haya de ser matizada. Por otro lado, aunque los incrementos de CORT en respuesta a estrés no sean diferentes en el cerebro entre animales jóvenes y viejos, no se puede descartar, como se ha apuntado anteriormente, que la capacidad de la CORT para producir cambios neuroanatómicos y funcionales que conduzcan a un daño neuronal sea mayor en el cerebro envejecido que en el joven.

6.1.3.Relación entre la corticosterona plasmática y la corticosterona libre en el cerebro.

Dado que la ausencia de diferencias en el incremento de CORT en respuesta a estrés en la CPF entre animales jóvenes y viejos era contraria a la idea generalizada en base a la bibliografía previa (Sapolsky *et al.*, 1984; Lorens *et al.*, 1990; Issa *et al.*, 1990; van Eekelen *et al.*, 1992; Segar *et al.*, 2009), se diseñaron experimentos con el fin de comprobar si existía una disociación entre los niveles de CORT plasmática total y los de CORT libre en el cerebro. En estos experimentos se evaluó, por tanto, la CORT plasmática total en respuesta a estrés agudo y la concentración de CORT libre en la CPF y el hipocampo en respuesta a ese mismo tipo de estrés en animales jóvenes (6 meses) y viejos (27 meses) mantenidos en condiciones estándar. Se eligieron como áreas de interés la CPF y el hipocampo por ser áreas cerebrales que presentan una alta densidad de receptores para glucocorticoides (Reul y de Kloet 1985; Meaney y Aitken 1985; McEwen *et al.*, 1986) y por estar involucradas tanto en la modulación de la

actividad del eje HHA (Herman *et al.*, 2005) como en diversas funciones cognitivas (Squire y Zola-Morgan 1988; Kim y Diamond 2002; Arnsten y Li 2005; Robbins 2005a)

El estrés incrementó tanto la concentración de CORT plasmática como la de CORT libre en la CPF y el hipocampo de animales jóvenes y viejos (Figuras 15 y 16). Sin embargo, mientras que el incremento de CORT plasmática fue mayor en los animales viejos, el incremento de CORT libre en el cerebro no fue diferente entre animales jóvenes y viejos. Son numerosos los trabajos que han mostrado un mayor incremento de CORT plasmática en animales viejos en respuesta a estrés (Sapolsky *et al.*, 1984; Lorens *et al.*, 1990; Issa *et al.*, 1990; van Eekelen *et al.*, 1992; Segar *et al.*, 2009). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, no se habían evaluado hasta ahora los incrementos de CORT en respuesta a estrés directamente en el cerebro de animales viejos. Estos resultados sugieren que los niveles de CORT en el cerebro no son un reflejo de los niveles de CORT evaluados en plasma. El hecho de que los incrementos de CORT libre tanto en CPF como en hipocampo no sean diferentes entre animales jóvenes y viejos, sugiere, como ya se ha comentado anteriormente, que los incrementos de CORT en respuesta a estrés podrían no ser un factor clave en los déficits cognitivos asociados a la edad, como sugería la “hipótesis de la cascada de glucocorticoides” (Sapolsky *et al.*, 1986).

El envejecimiento no modificó los niveles basales de CORT plasmática pero, sin embargo, incrementó los niveles basales de CORT libre en la CPF y el hipocampo. Se ha mostrado que los niveles basales de CORT plasmática en los animales viejos pueden ser mayores (Montaron *et al.*, 2006; Lupien *et al.*, 2009), o similares (Yau *et al.*, 1994; Meijer *et al.*, 2005; Segar *et al.*, 2009) a los de los animales jóvenes. Sin embargo, los niveles basales de CORT libre no se habían evaluado previamente en el cerebro de animales viejos. Estos datos, al igual que los de los incrementos de CORT en respuesta a estrés sugieren que podría haber una disociación entre los niveles plasmáticos y cerebrales de CORT, de modo que los últimos no siempre serían un reflejo de los primeros. Los resultados referentes a los niveles cerebrales de CORT libre basal, apoyarían la idea de la “hipótesis de la neurotoxicidad” que, como ya se ha mencionado, asocia mayores niveles basales de glucocorticoides en el cerebro envejecido con una mayor vulnerabilidad ante agentes neurotóxicos, lo que conllevaría cambios en áreas

relacionadas con la cognición y que conducirían a los déficits cognitivos asociados a la edad (Conrad 2008;Lupien *et al.*, 2009).

Posiblemente el aspecto más relevante de estos resultados, y que está cobrando importancia en los últimos años es la mencionada posible disociación entre los niveles de CORT en el cerebro y los niveles plasmáticos de CORT. De hecho, otros autores han mostrado también esas diferencias entre niveles plasmáticos y cerebrales de CORT tanto a nivel basal, como estimulados por estrés. A nivel basal se han mostrado tanto en la fase diurna del ritmo circadiano (Lengvári y Liposits 1977;Croft *et al.*, 2008), como en ratas que consumen alcohol y son expuestas a retirada del mismo (Little *et al.*, 2008). Esta misma disociación se ha mostrado con los niveles de CORT inducidos por estrés (Droste *et al.*, 2009a;Droste *et al.*, 2009b). Así, Droste *et al.*, (2009a) han mostrado que el incremento de CORT libre en hipocampo en respuesta a estrés no es diferente entre ratas hembra y macho, aun cuando se ha mostrado que las hembras muestran un mayor incremento de CORT plasmática en respuesta a estrés (Kant *et al.*, 1983;Handa *et al.*, 1994). Este mismo grupo de investigación ha mostrado que el incremento de CORT plasmática en respuesta a estrés por inmersión en agua es mayor en animales sedentarios que en animales que realizan ejercicio físico (Droste *et al.*, 2007), mientras que los incrementos de CORT libre en hipocampo no difieren al comparar ambos grupos experimentales al ser sometidos a este mismo tipo de estrés (Droste *et al.*, 2009b).

Una pregunta relevante en este contexto es la siguiente: ¿cuál es el posible mecanismo que explicaría las diferencias entre los niveles de CORT plasmática y los de CORT libre en el cerebro de los animales viejos? Existen al menos tres posibles mecanismos. En primer lugar, una mayor concentración de globulinas transportadoras de corticosterona (CBGs) en los animales viejos podría limitar el acceso de la CORT al cerebro. De hecho, se calcula que la CORT libre en el plasma constituye en torno al 5-10% del la CORT total (Rosner 1990). En contra de esta hipótesis, los dos únicos trabajos que han estudiado los niveles de CBGs en animales viejos muestran una reducción o ausencia de cambios de las mismas en los animales viejos (van Eekelen *et al.*, 1992;Meaney *et al.*, 1992). Sin embargo, una menor concentración de CBGs en los animales viejos sí que podría explicar, por contra, los mayores niveles basales de CORT libre observados en el cerebro de animales viejos. Un segundo mecanismo podría constituirlo un transportador

presente en la barrera hematoencefálica, la proteína resistente a multidrogas I tipo P-glicoproteína, que daría lugar a un exporte de CORT desde el cerebro (Uhr *et al.*, 2002;Müller *et al.*, 2003). Tanto una expresión incrementada de esta proteína en la barrera hematoencefálica como una mayor actividad de la misma, podrían explicar la ausencia de diferencias en los niveles de CORT inducidos por estrés entre animales jóvenes y viejos, dado que además se ha sugerido que la CORT podría incrementar la expresión del gen de este transportador (Altuvia *et al.*, 1993). Sin embargo, existen divergencias en la bibliografía acerca de cuáles son las moléculas que transporta esta proteína, ya que mientras que algunos trabajos sugieren que podría transportar CORT (Wolf y Horwitz 1992;Uhr *et al.*, 2002;Müller *et al.*, 2003) otros sugieren que sólo transportaría dexametasona y cortisol, pero no corticosterona (Meijer *et al.*, 1998;Mason *et al.*, 2008). Por último, en el cerebro se encuentra una enzima, la 11-beta-deshidrogenasa hidroxisteroide isoenzima tipo I, que convierte 11-beta-ceto-derivados en moléculas activas de CORT o cortisol (Holmes *et al.*, 2003;Tomlinson *et al.*, 2004). Se ha propuesto que en los animales viejos, una menor expresión de esta proteína podría proteger frente al daño potencial de la CORT (Yau y Seckl 2001). Sin embargo, al tratarse de un mecanismo intracelular, es poco probable que afecte de forma significativa a las medidas de CORT tomadas mediante la técnica de microdiálisis, que recogen la CORT presente en el espacio extracelular. Por tanto, estos resultados y los obtenidos por nuestro laboratorio sugieren la existencia de un mecanismo de contención que prevendría la sobre-exposición del cerebro a altas concentraciones de CORT (Droste *et al.*, 2009b).

6.2.Enriquecimiento ambiental y corticosterona.

El EA no modificó los efectos del envejecimiento sobre la concentración de CORT ni en plasma ni en el cerebro (CPF). Sin embargo, el EA produjo algunos efectos significativos sobre estos parámetros en animales jóvenes, que se detallan a continuación.

6.2.1.Corticosterona plasmática.

El EA redujo los niveles basales de CORT plasmática en los animales de 6 meses, pero no en los de 15 ó 24 meses (Figura 14). Los efectos del EA sobre los niveles basales de

CORT son controvertidos. Así, se ha mostrado que los animales mantenidos en EA presentan mayores (Marashi *et al.*, 2003; Moncek *et al.*, 2004; Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004), menores (Belz *et al.*, 2003; Sztainberg *et al.*, 2010) o similares (Falkenberg *et al.*, 1992; Mlynarik *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2009) niveles basales de CORT con respecto a animales aislados o en condiciones estándar. La variabilidad de estos resultados podría deberse a que los niveles basales de CORT sean muy sensibles a los diferentes protocolos de EA empleados, así como de los grupos controles con los que se compara al grupo de EA (Fox *et al.*, 2006; ver Discusión de Métodos pág. 137). La mayor concentración basal de CORT plasmática en los animales mantenidos en condiciones control podría ser relevante de cara a la “hipótesis de la neurotoxicidad”, de modo que el cerebro de estos animales podría ser más vulnerable ante la presencia de sustancias neurotóxicas.

6.2.2. Corticosterona libre en la corteza prefrontal.

Los resultados del presente trabajo muestran, además, que los niveles basales de CORT libre en la CPF no fueron diferentes entre animales mantenidos en EA y animales control. Sin embargo el análisis estadístico muestra una tendencia no significativa a ser mayores en los animales control en comparación con los mantenidos en EA, que se aprecia sobre todo en los animales de 6 y 24 meses (ver Tabla 6), y que se ve apoyada por los datos de CORT plasmática, donde los animales de 6 meses mantenidos en EA muestran menores niveles basales de CORT que los animales control. En base a la “hipótesis de la neurotoxicidad”, la tendencia de los niveles basales de CORT a ser mayores en los animales control podría ser relevante en relación con el envejecimiento, o incluso ante una mayor vulnerabilidad frente a agentes neurotóxicos en edades más tempranas. De hecho, se ha mostrado que los animales mantenidos en EA son menos vulnerables a los efectos negativos de un tratamiento crónico con CORT sobre la proliferación de células endoteliales en la CPF y el hipocampo (Ekstrand *et al.*, 2008).

El incremento de CORT libre producido por estrés en la CPF fue menor en los animales de 6 y 15 meses en condiciones de EA que en los controles. Si bien no existen datos acerca de los niveles de CORT libre en el cerebro en animales mantenidos en EA, sí que existen datos a nivel plasmático. Son diversos los trabajos que muestran que los animales mantenidos en EA muestran una menor liberación de CORT plasmática en

respuesta a estrés que animales control (Belz *et al.*, 2003; Moncek *et al.*, 2004; Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Mlynarik *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2009; Sztainberg *et al.*, 2010). Los menores incrementos de CORT libre en respuesta a estrés en la CPF en los animales mantenidos en EA podrían explicarse por una diferente reactividad al estrés causada por cambios en ciertas áreas cerebrales implicadas en la respuesta a estrés.

Los animales mantenidos en EA están sometidos de forma continua, debido a sus condiciones de vida, a breves episodios de estrés moderado, en lo que se ha dado en llamar “inoculación de estrés” (Fox *et al.*, 2006). Esta “inoculación de estrés” contribuiría a que, ante una situación novedosa, el animal mantenido en EA se adapte a la misma más eficazmente un animal mantenido en condiciones control. A este respecto, se ha mostrado que una menor reactividad al estrés a nivel conductual está relacionada con una mayor actividad de la CPF, que daría lugar a una liberación reducida de CORT plasmática, y de dopamina y serotonina en la CPF en un modelo de estrés controlado frente a estrés no controlado (Bland *et al.*, 2003; Amat *et al.*, 2005; Baratta *et al.*, 2007; Stalnaker *et al.*, 2009). Así, el procesamiento rápido y dependiente de neurotransmisión del agente estresante en la CPF podría ser responsable, al menos en parte, de la menor liberación de CORT en los animales mantenidos en EA, dado que la CPF juega un papel importante en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Diorio *et al.*, 1993; Spencer *et al.*, 2004; Radley *et al.*, 2006; Radley *et al.*, 2009). De hecho, la menor liberación de CORT en respuesta a estrés en los animales mantenidos en EA podría estar relacionada con la menor liberación de dopamina y acetilcolina mostrada en este mismo trabajo, dado que ambos neurotransmisores parecen jugar un papel importante en la regulación de la actividad del eje HHA actuando sobre la CPF (Borowsky y Kuhn 1992; Sullivan y Gratton 1998; Helm *et al.*, 2002; Helm *et al.*, 2004; Sullivan 2004; Radley *et al.*, 2006). Por otro lado, no puede excluirse el papel de otras áreas cerebrales, como la amígdala o el hipocampo, sobre las respuestas del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en respuesta a estrés (Goldstein *et al.*, 1996; Akana *et al.*, 2001; Herman *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 2005) y que podrían contribuir a las diferencias observadas en el presente trabajo. Además, estas áreas presentan una elevada densidad de receptores de glucocorticoides. Diferencias en la expresión de estos receptores en estas áreas entre animales mantenidos en EA y controles podrían contribuir a un diferente procesamiento emocional de la situación de estrés. De hecho,

se ha mostrado una mayor expresión de receptores GR en el hipocampo de animales mantenidos en EA, que se ha sugerido que podría contribuir a un control más eficaz del eje HHA en estos animales (Olsson *et al.*, 1994; Dahlqvist *et al.*, 1999).

7. Consideraciones finales y generales acerca del enriquecimiento ambiental y sus efectos sobre la respuesta a estrés.

La menor respuesta a estrés tanto a nivel neuroquímico como hormonal, de los animales mantenidos en EA frente a animales mantenidos en condiciones control podría ser entendida en el contexto de lo que se ha denominado “inoculación de estrés” (Fox *et al.*, 2006) e “inmunización” frente al estrés (Maier *et al.*, 2006). Por un lado, la exposición al EA supone una interacción incrementada con otros individuos y con un entorno cambiante, que somete al individuo a episodios de estrés moderado de forma repetida, por lo que se daría en estos animales un proceso similar al de la habituación, que es lo que se ha denominado “inoculación de estrés” (Fox *et al.*, 2006). Por otro lado, la “inmunización frente al estrés” supone que el enfrentarse de forma continua a episodios de estrés controlado da lugar a que el individuo, al ser expuesto a un estrés incontrolado, responda ante él como si éste fuese controlado (Maier *et al.*, 2006). Por tanto, una hipótesis que podría explicar los resultados mostrados en el presente trabajo es que la menor respuesta de los sistemas dopaminérgico y colinérgico a estrés en la CPF y de la liberación de CORT en los animales mantenidos a EA pudiera ser causada por el proceso de “inoculación de estrés”, que conduciría a la larga a una “inmunización”.

Es bien conocido que uno de los condicionantes de la magnitud de la respuesta a estrés es la percepción de controlabilidad del mismo (Lupien *et al.*, 2007). Diversos trabajos han mostrado que el estrés controlado da lugar a menores respuestas de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en la CPF, así como a cambios en la respuesta a condicionamiento a miedo o a una prueba de latencia de escape, en la que se evalúa la capacidad del animal para huir de una situación potencialmente peligrosa (Carlson *et al.*, 1993; Bland *et al.*, 2003; Amat *et al.*, 2005; Baratta *et al.*, 2007). Además, el estrés controlado da lugar a una menor activación del gen de acción temprana *c-fos* en áreas relacionadas con la regulación de la respuesta a estrés (Stalnaker *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Es importante señalar el hecho de que se ha mostrado que la activación de la CPF medial es imprescindible para que tengan lugar estos efectos del estrés controlado

o para reducir, en general, la actividad del eje HHA (Amat *et al.*, 2005; Baratta *et al.*, 2007; Stalnaker *et al.*, 2009; Weinberg *et al.*, 2010), aunque también la amígdala podría jugar un papel importante en los mismos (Goldstein *et al.*, 1996; Maier *et al.*, 2006). Por último, y de especial relevancia es el hecho de que la exposición a estrés controlado de forma repetida da lugar a que, ante la exposición a un estrés incontrolado, el individuo muestre respuestas neuroquímicas y conductuales similares a las de la exposición a un estrés controlado (Maier *et al.*, 2006; Amat *et al.*, 2010).

En base a estos datos, la menor respuesta a estrés de los sistemas dopaminérgico y colinérgico en la CPF en animales mantenidos en EA mostrada en el presente trabajo permitiría una mayor activación de la CPF medial (asumiendo un papel inhibitorio de estas entradas sobre las eferencias corticales) (Hains y Arnsten 2008), que de ese modo inhibiría a través de proyecciones indirectas a diversos núcleos mesencefálicos como el área tegmental ventral, el rafe dorsal, o el *locus coeruleus*, así como a otras áreas cerebrales, como el núcleo basal magnocelular o la amígdala, que habitualmente se activan ante una situación de estrés. La inhibición de estas áreas cerebrales conduciría a una mejor adaptación al agente estresante (Robbins, 2005b). Por otro lado, a pesar de que no hay datos acerca de la activación de *c-fos* en respuesta a estrés en animales mantenidos en EA, sí se ha mostrado una mayor expresión de este gen en la corteza infralímbica en ratones sometidos por primera vez a condiciones de EA (Ali *et al.*, 2009), lo que podría apoyar la idea de que el EA produce una mayor actividad en la CPF. Son necesarios futuros experimentos para poner a prueba esta hipótesis evaluando la activación e inactivación, en condiciones de estrés de la CPF y la amígdala en animales mantenidos en EA y condiciones control.

En relación a los resultados observados en la presente Tesis Doctoral relativos a la CORT y el EA con los de controlabilidad su interpretación puede presentar dificultades. Los trabajos que han evaluado la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal han mostrado que el estrés controlado puede tanto reducir como no modificar la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Heinsbroek *et al.*, 1991; Maier *et al.*, 2006), si bien un estudio reciente ha mostrado que el incremento de actividad de la CPF mediante picrotoxina da lugar a una menor liberación de CORT en respuesta a estrés (Weinberg *et al.*, 2010). La regulación de la liberación de CORT, por tanto, puede estar parcialmente regulada por el componente de controlabilidad del agente estresante,

además de estar mediada por otros mecanismos. Por ejemplo, se ha mostrado que los animales mantenidos en EA muestran una mayor densidad de receptores de glucocorticoides en la CPF y el hipocampo que podrían dar lugar a un más eficaz control de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en estos animales (Olsson *et al.*, 1994; Dahlqvist *et al.*, 1999). Además, cambios neuroquímicos en ciertas áreas cerebrales como la amígdala el hipocampo, o el septum, que también controlan la liberación de CORT podrían explicar las diferencias observadas. Recientemente se ha mostrado que la menor ansiedad mostrada por los animales mantenidos en EA en diversas pruebas conductuales podría estar relacionada con una reducción en la densidad de receptores de CRH de tipo I en la amígdala (Sztainberg *et al.*, 2010). Este mismo trabajo ha mostrado que la supresión de la expresión de estos receptores en la amígdala mediante el empleo de ARNs de interferencia en animales mantenidos en condiciones estándar da lugar a que estos animales se comporten como los mantenidos en EA, es decir, muestran bajos niveles de ansiedad en diversas pruebas conductuales.

Una cuestión importante a tener en cuenta acerca de los efectos del EA sobre la respuesta a estrés es la referente a los cambios que se producen en el cerebro de los animales durante el tiempo que se encuentran mantenidos en esas condiciones ambientales. Estos cambios son, en teoría, los causantes de la mejor adaptación de los animales mantenidos en EA a una situación de estrés, que darían lugar a la menor liberación de dopamina, acetilcolina o CORT en respuesta a la misma en los animales mantenidos en EA. Estudios previos han sugerido que las neuronas generadas durante la edad adulta en el hipocampo podrían tener un papel importante en las respuestas a estrés. Así, se ha mostrado que la neurogénesis adulta en esta área cerebral está implicada en conductas relacionadas con la ansiedad, de modo que los animales que carecen de estas nuevas neuronas muestran elevados niveles de ansiedad (Santarelli *et al.*, 2003; Revest *et al.*, 2009). Dado que los animales mantenidos en condiciones de EA muestran mayores niveles de neurogénesis en hipocampo (Kempermann *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2003; Segovia *et al.*, 2006) y que sus respuestas a estrés están claramente atenuadas tanto a nivel neuroquímico como hormonal, así como conductualmente su respuesta a diversas pruebas de ansiedad (Fernández-Teruel *et al.*, 1997; Wolfer *et al.*, 2004; Sztainberg *et al.*, 2010), es posible que esos mayores niveles de neurogénesis pudieran jugar algún papel en esta menor reactividad al estrés de los animales mantenidos en EA. Esta hipótesis ha sido, de hecho, puesta a prueba en dos

estudios recientes aunque con objetivos diferentes. Uno de ellos ha mostrado que la supresión de la neurogénesis en los animales mantenidos en EA no modifica la menor ansiedad mostrada por estos animales en dos pruebas conductuales (Meshi *et al.*, 2006). El otro ha mostrado, mediante un modelo condicional de neurogénesis en ratón que ésta sería necesaria para la recuperación conductual de la exposición previa a estrés psicosocial provocado por la exposición a un macho dominante (Schloesser *et al.*, 2010). Son necesarios, sin embargo, más trabajos a este respecto pues se han obtenido resultados contradictorios no sólo en cuanto al posible papel de la neurogénesis en la ansiedad, sino en cuanto a su implicación en la memoria espacial. De hecho, si bien el trabajo de Meshi *et al.* (2006) tampoco apoya la idea de que la neurogénesis incrementada en los animales mantenidos en EA juegue un papel importante en su mejor memoria espacial, otro trabajo anterior mostró que la neurogénesis sí podría explicar la mejor eficacia en la realización de una prueba de reconocimiento de objetos por parte de los animales mantenidos en EA (Bruehl-Jungerman *et al.*, 2005).

Otra hipótesis alternativa que podría explicar los resultados obtenidos tendría que ver con la interacción entre la CORT y los neurotransmisores dopamina y acetilcolina. Algunos trabajos han estudiado el posible control de la CORT sobre los niveles de dopamina o acetilcolina en la CPF. Mizoguchi *et al.*, (2004) mostraron que la adrenalectomía da lugar a una reducción de la liberación de dopamina estimulada por altas concentraciones de potasio y afecta asimismo a una prueba de memoria dependiente de memoria de trabajo, por lo que sugirieron que la CORT podría controlar la liberación de dopamina. Además, se ha sugerido que la CORT podría potenciar los efectos del glutamato sobre sus receptores NMDA en las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, que proyectan a la CPF y al núcleo accumbens (Cho y Little 1998). Estos resultados sugieren que una mayor concentración de CORT podría dar lugar a una mayor respuesta del sistema dopaminérgico en la CPF. Sin embargo, Imperato *et al.* (1991), estudiaron de forma específica si los incrementos de CORT modulan los incrementos de dopamina en la CPF en respuesta a estrés empleando ratas adrenalectomizadas, así como antagonistas de los receptores de glucocorticoides. Sus resultados mostraron que no existe relación alguna entre ambos incrementos, por lo que los consideraron independientes entre sí. Son necesarios, por tanto, más experimentos para determinar si existe alguna relación entre estos incrementos, si ésta se establece a corto o a largo plazo y si finalmente esta relación explicaría la menor liberación de

dopamina en la CPF en respuesta a estrés de los animales mantenidos en EA. Con respecto a la relación entre CORT y acetilcolina, los trabajos son más escasos. Se ha mostrado que la adrenalectomía da lugar a una potenciación de la respuesta del sistema septo-hipocampal a la perfusión local en hipocampo de altas dosis de potasio (Mizoguchi *et al.*, 2008). En la CPF se ha observado que la adrenalectomía no modifica los niveles basales de acetilcolina en la CPF, pero sí da lugar a un mayor incremento de acetilcolina en respuesta a una inyección de solución salina, o a una recuperación retrasada de sus niveles basales en respuesta a una inyección sistémica de cocaína (Day *et al.*, 1997). El estudio de esta posible relación entre CORT y dopamina o acetilcolina es todavía escaso, por lo que son necesarios más experimentos en este sentido para probar si ésta puede explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Por último, y en relación con las hipótesis previas, es interesante mencionar el hecho de que los fármacos antidepresivos tienden a producir efectos similares a los del EA. Así, por ejemplo, se ha mostrado que los antidepresivos incrementan la neurogénesis (Malberg 2004), reducen la respuesta del eje HHA a una situación estresante (Szymánska *et al.*, 2009; Rogóz *et al.*, 2009) y reducen asimismo la liberación de dopamina y acetilcolina en respuesta a estrés en la CPF (Dazzi *et al.*, 2001a; Dazzi *et al.*, 2001b). No se ha estudiado en detalle, sin embargo, si los efectos producidos por el EA sobre la respuesta a estrés tendrían que ver con los mecanismos que emplean los antidepresivos para llevar a cabo su función. A este respecto son, por ejemplo, escasos los trabajos en los que se han evaluado la serotonina o la expresión de sus receptores en el cerebro de animales mantenidos en EA (Por y Bondy 1982; Rasmuson *et al.*, 1998; Brenes *et al.*, 2008).

El EA, sin embargo, y en contra de la hipótesis del presente trabajo, no produjo cambios sobre las tendencias mostradas a lo largo del envejecimiento de los parámetros evaluados. A pesar de que se ha descrito una atenuación en animales mantenidos en EA sobre los cambios que produce el envejecimiento sobre ciertos parámetros, como la arborización dendrítica y la sinaptogénesis (Greenough *et al.*, 1986; Saito *et al.*, 1994; Frick y Fernandez 2003; Markham y Greenough 2004; Leal-Galicia *et al.*, 2008), o sobre ciertos parámetros conductuales, como la memoria espacial (Frick y Fernandez 2003; Fernández *et al.*, 2004; Segovia *et al.*, 2006), el EA no parece modificar los efectos producidos por el envejecimiento sobre los parámetros evaluados en el presente trabajo

y que tienen relación con la respuesta a estrés. Esto podría ser debido a que los sistemas de respuesta a estrés, al menos en lo que refiere a la CPF, se desarrollen durante las primeras etapas del desarrollo, de modo que los cambios que acontecen en este sistema con el envejecimiento quedan de algún modo determinados desde esas etapas tempranas. De hecho, son numerosos los estudios que muestran que diversas manipulaciones ambientales durante la etapa puberal de los animales pueden condicionar las respuestas a estrés durante las etapas adultas (Levine 2005; Laviola *et al.*, 2008). En apoyo de esta idea, los efectos del mantenimiento de los animales durante 3 meses en condiciones de EA sobre los incrementos de CORT en la CPF en respuesta a estrés, mostrados en la presente Tesis Doctoral, fueron más acusados en los animales de 6 y 15 meses que en los animales de 27 meses. Es posible además que los efectos del EA sobre los cambios que produce el envejecimiento sean más importantes en otras áreas cerebrales, como el hipocampo (van Praag *et al.*, 2000; Segovia *et al.*, 2006).

Es interesante, sin embargo, resaltar que si bien el EA no modificó la tendencia mostrada a lo largo del envejecimiento sobre estos parámetros relacionados con el estrés, sí que redujo algunas respuestas en los animales de 24 meses, especialmente en lo que refiere a la liberación de dopamina y acetilcolina en la CPF. Esta reducida respuesta en los animales envejecidos mantenidos en EA podría tener importantes consecuencias funcionales, como ya se ha discutido previamente, que contribuirían a una menor reactividad al estrés de los animales envejecidos mantenidos en condiciones de EA. Por otro lado, aunque no ha sido evaluada en el presente trabajo, la exposición durante toda la vida adulta del animal a las condiciones de EA podría ayudar a reducir la respuesta a estrés del eje HHA, lo que sería relevante como tratamiento protector ante los posibles efectos perjudiciales de los glucocorticoides durante el envejecimiento (Lupien *et al.*, 2009; Bishop *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1. El estrés agudo moderado reduce la memoria de trabajo e incrementa la concentración extracelular de dopamina, acetilcolina y corticosterona pero no la de glutamato en la corteza prefrontal de la rata.
2. El envejecimiento reduce la respuesta a estrés del sistema dopaminérgico pero no la del sistema colinérgico en la corteza prefrontal. Esto sugiere que el envejecimiento produce un efecto diferencial sobre la activación de estos sistemas de neurotransmisión en esta área del cerebro.
3. El envejecimiento reduce tanto la actividad motora espontánea como la memoria de trabajo, pero no modifica esta última en condiciones de estrés. Esto sugiere que el envejecimiento produce déficits en conductas motoras y cognitivas asociadas a la corteza prefrontal.
4. El envejecimiento potencia los incrementos de corticosterona en plasma pero no en el cerebro (hipocampo y la corteza prefrontal) en respuesta a estrés, lo que sugiere que existe una disociación entre los niveles de corticosterona en plasma frente a los niveles en cerebro. Por otro lado, el envejecimiento incrementa los niveles basales de corticosterona en el hipocampo y la corteza prefrontal.
5. El enriquecimiento ambiental reduce la respuesta a estrés de los sistemas dopaminérgico y colinérgico en la corteza prefrontal. Esto sugiere que unas condiciones ambientales favorables pueden reducir la actividad de diferentes sistemas de neurotransmisión en la corteza prefrontal en respuesta a un estímulo fisiológico como el estrés.
6. El enriquecimiento ambiental reduce la actividad motora espontánea. Esto sugiere que estas condiciones ambientales pueden facilitar la habituación a una situación novedosa. El enriquecimiento ambiental, sin embargo, no modifica la memoria de trabajo ni en condiciones basales ni en condiciones de estrés.

7. El enriquecimiento ambiental reduce la concentración extracelular de corticosterona en respuesta a estrés en la corteza prefrontal de animales jóvenes. Esto sugiere que unas condiciones ambientales favorables pueden reducir la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en respuesta a una situación de estrés.

8. El enriquecimiento ambiental no modifica el patrón de incrementos en respuesta a estrés observado a lo largo del proceso de envejecimiento en los parámetros neuroquímicos (dopamina y acetilcolina) y hormonales (corticosterona) evaluados en la corteza prefrontal. Asimismo, el enriquecimiento no modifica los déficits que produce el envejecimiento sobre la actividad motora y la memoria de trabajo. Estos resultados sugieren que la interacción con unas condiciones ambientales favorables no atenúa los cambios producidos por el envejecimiento sobre las respuestas neuroquímicas, hormonales y conductuales asociadas a la corteza prefrontal.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

- Abercrombie E. D., Keefe K. A., Daniel S. D. y Zigmond M. J. (1989) Differential effects of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J. Neurochem.* 52, 1655-1658.
- Acquas E., Wilson C. y Fibiger H. C. (1996) Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J. Neurosci.* 16, 3089-3096.
- Afifi T. O., Asmundson G. J. G., Taylor S. y Jang K. L. (2010) The roles of genes and environment on trauma exposure and posttraumatic stress disorder symptoms: a review of twin studies. *Clin Psychol Rev* 30, 101-112.
- Akana S. F., Chu A., Soriano L. y Dallman M. F. (2001) Corticosterone exerts site-specific and state-dependent effects in prefrontal cortex and amygdala on regulation of adrenocorticotrophic hormone, insulin and fat depots. *J. Neuroendocrinol.* 13, 625-637.
- Ali A. E. A., Wilson Y. M. y Murphy M. (2009) A single exposure to an enriched environment stimulates the activation of discrete neuronal populations in the brain of the fos-tau-lacZ mouse. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 381-390.
- Allison L. A., Mayer G. N. y Shoup R. E. (1984) O-phthalaldehyde derivates of amines for high speed liquid chromatography electrochemistry. *Ann. Chem.* 56, 1089-1096.
- Altuvia S., Stein W. D., Goldenberg S., Kane S. E., Pastan I. y Gottesman M. M. (1993) Targeted disruption of the mouse *mdr1b* gene reveals that steroid hormones enhance *mdr* gene expression. *J. Biol. Chem.* 268, 27127-27132.
- Amat J., Alekseyev R. M., Paul E., Watkins L. R. y Maier S. F. (2010) Behavioral control over shocks: behavioral and neurochemical effects of later social defeat. *Neuroscience* 165, 1031-1038.
- Amat J., Baratta M. V., Paul E., Bland S. T., Watkins L. R. y Maier S. F. (2005) Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat. Neurosci.* 8, 365-371.
- Anderson G. M. (1993) High performance liquid chromatographic analysis of monoamines and metabolites in body fluids, en *High performance liquid chromatography in neuroscience research*, (Holman R. B., Cross A. J. y Joseph M. H., eds), pp. 55-88. John Wiley&Sons,Ltd., Chichester (England).
- Andin J., Hallbeck M., Mohammed A. H. y Marcusson J. (2007) Influence of environmental enrichment on steady-state mRNA levels for EAAC1, AMPA1 and NMDA2A receptor subunits in rat hippocampus. *Brain Res.* 1174, 18-27.
- Anstey K. y Chistensen H. (2000) Education, activity, health, blood pressure and apolipoprotein E as predictors of cognitive change in old age: a review. *Gerontology* 46, 163-177.

- Araki T., Kato H., Fujiwara T. y Itoyama Y. (1995) Age-related changes in binding of second messengers in the rat brain. *Brain Res.* 704, 227-232.
- Armario A., Escorihuela R. M. y Nadal R. (2008) Long-term neuroendocrine and behavioral effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1121-1135.
- Arnsten A. F. y Goldman-Rakic P. S. (1998) Noise stress impairs prefrontal cortical cognitive function in monkeys. *Arch. Gen. Psychiatry* 55, 362-368.
- Arnsten A. F. y Li B. (2005) Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol. Psychiatry* 57, 1377-1384.
- Arnsten A. F. T. (1998) Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. *Trends Cognitive Sci.* 2, 436-447.
- Aultman J. M. y Moghaddam B. (2001) Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task. *Psychopharmacology* 153, 353-364.
- Bäckman L., Nyberg L., Lindenberger U., Li S. C. y Farde L. (2006) The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: Current status and future prospects. *Neurosci & Biobehav Rev* 30, 791-807.
- Baddeley A. (1992) Working memory. *Science* 255, 556-559.
- Bagley J. y Moghaddam B. (1997) Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. *Neuroscience* 77, 65-73.
- Baker D. A. y Kalivas P. W. (2007) Insights into glutamate physiology: contribution of studies utilizing in vivo microdialysis, en *Handbook of Microdialysis*, (Westerink B. H. C. y Cremers T. I. F. H., eds), pp. 33-46. Academic Press, London.
- Baratta M. V., Christianson D. M., Gomez D. M., Zarza C. M., Amat J., Masini C. V., Watkins L. R. y Maier S. F. (2007) Controllable versus uncontrollable stressors bi-directionally modulate conditioned but not innate fear. *Neuroscience* 146, 1495-1503.
- Barbelivien A., Herbeaux K., Oberling P., Kelche C., Galani R. y Majchrzak M. (2006) Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat. *Behav. Brain Res.* 169, 231-238.
- Bardo M. T., Bowling S. L., Rowlett J. K., Manderscheid P., Buxton S. T. y Dwoskin L. P. (1995) Environmental enrichment attenuates locomotor sensitization, but not in vitro dopamine release, induced by amphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51, 397-405.
- Barili P., De Carolis G., Zaccheo D. y Amenta F. (1998) Sensitivity to ageing of the limbic dopaminergic system: a review. *Mech. Ageing Dev.* 106, 57-92.
- Barnea A. y Nottebohm F. (1994) Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11217-11221.

- Bartus R. T., Dean R. L., Beer B. y Lippa A. S. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408-417.
- Bartus R. T. (2000) On neurodegenerative diseases, models and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* 163, 529.
- Bats S., Thoumas J. L., Lordi B., Tonon M. C., Lalonde R. y Caston J. (2001) The effects of a mild stressor on spontaneous alternation in mice. *Behav. Brain Res.* 118, 11-15.
- Baxter M. G. y Chiba A. A. (1999) Cognitive functions of the basal forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 178-183.
- Beaufour C. C., Le Bihan C., Hamon M. y Thiebot M. (2001) Extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during reward-punishment- and novelty-associated behaviour. Effects of diazepam. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69, 133-142.
- Belz E. E., Kennell J. S., Czambell R. K., Rubin R. T. y Rhodes M. E. (2003) Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 76, 481-486.
- Benaroya-Milshtein N., Hollander N., Apter A., Kukulansky T., Raz N., Wilf A., Yaniv I. y Pick C. G. (2004) Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1341-1347.
- Benefiel A. C., Dong W. K. y Greenough W. T. (2005) Mandatory "enriched" housing of laboratory animals: the need for evidence-based evaluation. *ILAR Journal* 46, 95-105.
- Benveniste H. (1989) Brain microdialysis. *J. Neurochem.* 52, 1667-1679.
- Benveniste H. y Hansen A. J. (1991) Practical aspects of using microdialysis for determination of brain interstitial concentrations, en *Microdialysis in the Neurosciences*, (Robinson T. E. y Justice J. B., eds), pp. 81-102. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Benveniste H., Hansen A. J. y Ottoson N. S. (1989) Determination of brain interstitial concentrations by microdialysis. *J. Neurochem.* 52, 1741-1750.
- Berridge C. W., Mitton E., Clark W. y Roth R. H. (1999) Engagement in a non-escape (displacement) behavior elicits a selective and lateralized suppression of frontal cortical dopaminergic utilization in stress. *Synapse* 32, 187-197.
- Bimonte H. A., Hyde L. A., Hoplight B. J. y Denenberg V. H. (2000) In two species, females exhibit superior working memory and inferior reference memory on the water radial-arm maze. *Physiol. Behav.* 70, 311-317.
- Bimonte H. A., Nelson M. E. y Granholm A. C. (2003) Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. *Neurobiol. Aging* 24, 37-48.

- Birrell J. M. y Brown V. J. (2000) Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J. Neurosci.* 20, 4320-4324.
- Bishop N.A., Lu T. y Yanker B.A. (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline, *Nature* doi: 10.1038/nature08983 .
- Bizon J. L., Helm K. A., Han J. S., Chun H. J., Pucilowska J., Lund P. K. y Gallagher M. (2001) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1739-1751.
- Björklund A. y Dunnett S. B. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194-202.
- Black J. E., Polinsky M. y Greenough W. T. (1989) Progressive failure of cerebral angiogenesis supporting neural plasticity in aging rats. *Neurobiol. Aging* 10, 353-358.
- Black J. E., Sirevaag A. M. y Greenough W. T. (1987) Complex experience promotes capillary formation in young rat visual cortex. *Neurosci. Lett.* 83, 351-355.
- Bland S. T., Hargrave D., Pepin J. L., Amat J., Watkins L. R. y Maier S. F. (2003) Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux and morphine-induced serotonin efflux in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 28, 1589-1596.
- Borowsky B. y Kuhn C. M. (1992) D₁ and D₂ dopamine receptors stimulate hypothalamo-pituitary-adrenal activity in rats. *Neuropharmacology* 31, 671-678.
- Boyle M. P., Brewer J. A., Funatsu M., Wozniak D. F., Tsien J. Z., Izumi Y. y Muglia L. J. (2005) Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102, 473-478.
- Braak H. y Braak E. (1986) Ratio pyramidal cells versus non-pyramidal cells in the human frontal isocortex and changes in ratio with aging and Alzheimer's disease, en *Aging of the brain and Alzheimer's disease*, (Swaab D. F., Fliers E., Mirmiran M., Van Gool W. A. y Van Haaren F., eds), pp. 185-212. Elsevier, Amsterdam.
- Brake W. G., Flores G., Francis D., Meaney M. J., Srivastava L. K. y Gratton A. (2000) Enhanced nucleus accumbens dopamine and plasma corticosterone stress responses in adult rats with neonatal excitotoxic lesions to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 96, 687-695.
- Braver T. S. y Barch D. M. (2002) A theory of cognitive control, aging, cognition, and neuromodulation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 809-817.
- Bredy T. W., Zhang T. Y., Grant R. J., Diorio J. y Meaney M. J. (2004) Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1355-1362.

- Birrell J. M. y Brown V. J. (2000) Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J. Neurosci.* 20, 4320-4324.
- Bishop N.A., Lu T. y Yanker B.A. (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline, *Nature* doi: 10.1038/nature08983 .
- Bizon J. L., Helm K. A., Han J. S., Chun H. J., Pucilowska J., Lund P. K. y Gallagher M. (2001) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1739-1751.
- Björklund A. y Dunnett S. B. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194-202.
- Black J. E., Polinsky M. y Greenough W. T. (1989) Progressive failure of cerebral angiogenesis supporting neural plasticity in aging rats. *Neurobiol. Aging* 10, 353-358.
- Black J. E., Sirevaag A. M. y Greenough W. T. (1987) Complex experience promotes capillary formation in young rat visual cortex. *Neurosci. Lett.* 83, 351-355.
- Bland S. T., Hargrave D., Pepin J. L., Amat J., Watkins L. R. y Maier S. F. (2003) Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux and morphine-induced serotonin efflux in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 28, 1589-1596.
- Borowsky B. y Kuhn C. M. (1992) D₁ and D₂ dopamine receptors stimulate hypothalamo-pituitary-adrenal activity in rats. *Neuropharmacology* 31, 671-678.
- Boyle M. P., Brewer J. A., Funatsu M., Wozniak D. F., Tsien J. Z., Izumi Y. y Muglia L. J. (2005) Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102, 473-478.
- Braak H. y Braak E. (1986) Ratio pyramidal cells versus non-pyramidal cells in the human frontal isocortex and changes in ratio with aging and Alzheimer's disease, en *Aging of the brain and Alzheimer's disease*, (Swaab D. F., Fliers E., Mirmiran M., Van Gool W. A. y Van Haaren F., eds), pp. 185-212. Elsevier, Amsterdam.
- Brake W. G., Flores G., Francis D., Meaney M. J., Srivastava L. K. y Gratton A. (2000) Enhanced nucleus accumbens dopamine and plasma corticosterone stress responses in adult rats with neonatal excitotoxic lesions to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 96, 687-695.
- Braver T. S. y Barch D. M. (2002) A theory of cognitive control, aging, cognition, and neuromodulation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 809-817.
- Bredy T. W., Zhang T. Y., Grant R. J., Diorio J. y Meaney M. J. (2004) Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1355-1362.

- Brenes J. C., Rodriguez O. y Fornaguera J. (2008) Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 89, 85-93.
- Broersen L. M., Heinsbroek R. P. W., De Bruin J. P. C., Uylings H. B. M. y Olivier B. (1995) The role of the medial prefrontal cortex of rats in short-term memory functioning: further support for involvement of cholinergic, rather than dopaminergic mechanisms. *Brain Res.* 674, 221-229.
- Brown J., Cooper-Kuhn C. M., Kempermann G., van Praag H., Winkler J., Gage F. H. y Kuhn H. G. (2003) Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2042-2046.
- Brown V. J. y Bowman E. M. (2002) Rodent models of prefrontal cortical function. *Trends Neurosci.* 25, 340-343.
- Brozoski T. J., Brown R. M., Rosvold H. E. y Goldman P. S. (1979) Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of Rhesus monkey. *Science* 205, 929-932.
- Bruel-Jungerman E., Laroche S. y Rampon C. (2005) New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 21, 513-521.
- Brummelte S. y Teuchert-Noodt G. (2007) Density of dopaminergic fibres in the prefrontal cortex of gerbils is sensitive to aging. *Behav. Brain Funct.* 3, 14.
- Burke S. N. y Barnes C. A. (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Neurosci.* 7, 30-40.
- Butcher S. P., Liptrot J. y Aburthnott G. W. (1991) Characterisation of methylphenidate and nomifensine induced dopamine release in rat striatum using *in vivo* brain microdialysis. *Neurosci. Lett.* 122, 245-248.
- Cai J. X. y Arnsten A. F. (1997) Dose-dependent effects of the dopamine D1 receptor agonists A77636 or SKF81297 on spatial working memory in aged monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 183-189.
- Cameron H. A. y Gould E. (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61, 203-209.
- Carlson J. N., Fitzgerald L. W., Keller R. W. Jr. y Glick S. D. (1993) Lateralized changes in prefrontal cortical dopamine activity induced by controllable and uncontrollable stress in the rat. *Brain Res.* 630, 178-187.
- Carr D. B. y Sesack S. R. (2000) Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J. Neurosci.* 20, 3864-3873.
- Carr D. B. y Sesack S. R. (1996) Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J. Comp. Neurol.* 369, 1-15.

- Carrillo-Mora P., Giordano M. y Abel S. (2009) Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav. Brain Res.* 203, 151-164.
- Carter A. J. (1994) Microbore high-performance liquid chromatographic method for the measurement of dopamine and its metabolites: recommendations for optimal sample collection and storage. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 660, 158-163.
- Carter A. J. y Kehr J. (1997) Microbore high performance liquid chromatographic method for measuring acetylcholine in microdialysis samples: optimizing performance of platinum electrodes. *J. Chromatogr. B* 692, 207-212.
- Castañeda T. R., Marquez de Prado B., Prieto D. y Mora F. (2004) Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J. Pineal Res.* 36, 117-185.
- Castner S. A. y Goldman-Rakic P. S. (2004) Enhancement of working memory in aged monkeys by a sensitizing regimen of dopamine D1 receptor stimulation. *J. Neurosci.* 24, 1446-1450.
- Castner S. A., Goldman-Rakic P. S. y Williams G. V. (2004) Animal models of working memory: insights for targeting cognitive dysfunction in schizophrenia. *Psychopharmacology* 174, 111-125.
- Cerqueira J. J., Taipa R., Uylings H. B. M., Almeida O. F. X. y Sousa N. (2007) Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens. *Cereb. Cortex* 17, 1998-2006.
- Chauvet C., Lardeux V., Goldberg S. R., Jaber M. y Solinas M. (2009) Environmental enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induced by cues and stress but not by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 34, 2767-2778.
- Chefer V. I., Zapata A., Shippenberg T. S. y Bungay P. M. (2006) Quantitative no-net-flux microdialysis permits detection of increases and decreases in dopamine uptake in mouse nucleus accumbens. *J. Neurosci. Methods* 155, 187-193.
- Chefer V. L., Thompson A. C., Zapata A. y Shippenberg T. S. (2009) Overview of brain microdialysis. *Curr. Protoc. Neurosci.* 7.1.1, 1-28.
- Cho K. y Little H. J. (1998) Effects of corticosterone on excitatory amino acid responses in dopamine-sensitive neurons in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 88, 837-845.
- Chudasama Y. y Robbins T. W. (2004) Dopaminergic modulation of visual attention and working memory in the rodent prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 29, 1628-1636.
- Clements J. D. (1996) Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci.* 19, 163-171.

- Cobo M., Expósito I. y Mora F. (1993) Aging, prefrontal cortex, and amino acid neurotransmitters: differential effects produced by electrical stimulation. *Neurobiol. Aging* 14, 187-190.
- Coleman P. D. y Flood D. G. (1986) Dendritic proliferation in the aging brain as a compensatory repair mechanism, en *Aging of the brain and Alzheimer's disease. Progress in brain research. Vol. 70*, (Swaab D. F., Fliers E., Mirmiran M., Van Gool W. A. y Van Haaren F., eds), pp. 227-237. Elsevier, Amsterdam.
- Conrad, C.D. (2008), Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: The glucocorticoid vulnerability hypothesis, *Rev. Neurosci.* 19, 395-411.
- Consolo S., Wu F. C., Fiorentini F., Ladinsky H. y Vezzani A. (1987) Determination of endogenous acetylcholine release in freely moving rats by transstriatal dialysis coupled to a radioenzymatic assay: effect of drugs. *J. Neurochem.* 48, 1459-1465.
- Cooper J. R., Bloom F. E. y Roth R. H. (1996) *The biochemical basis of neuropharmacology*. Oxford University Press, New York.
- Cotman C. W. y Berchtold N. C. (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295-301.
- Cotman C. W., Monaghan D. T., Ottersen O. P. y Storm-Mathisen J. (1987) Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci.* 10, 273-280.
- Crawford C. A. y Levine M. S. (1997) Dopaminergic function in the neostriatum and nucleus accumbens of young and aged Fisher 344 rats. *Neurobiol. Aging* 18, 57-66.
- Croft A. P., O'Callaghan M. J., Shaw S. G., Connolly G., Jacquot C. y Little H. J. (2008) Effects of minor laboratory procedures, adrenalectomy, social defeat or acute alcohol on regional brain concentrations of corticosterone. *Brain Res.* 1238, 12-22.
- Cull-Candy S., Brickley S. y Farrant M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 327-335.
- Dahlqvist P., Zhao L., Johansson I. M., Mattson B., Johansson B. B., Seckl J. R. y Olsson T. (1999) Environmental enrichment alters nerve growth factor-induced gene A and glucocorticoid receptor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience* 93, 527-535.
- Dalley J. W., Cardinal R. N. y Robbins R. J. (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 771-784.
- Dalley J. W., Fryer T. D., Brichard L., Robinson D. S., Theobald D. E., Lääne K., Peña Y., Murphy E. R., Shah Y., Probst K., Abakumova I., Aigbirhio I., Richards H. K., Hong Y., Baron J. C., Everitt B. J. y Robbins R. J. (2007) Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science* 315, 1267-1270.
- Dalley J. W. y Everitt B. J. (2009) Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 403-410.

- Dallman M. F. (2005) Fast glucocorticoid actions on brain: Back to the future. *Front. Neuroendocrinol.* 26, 103-108.
- Damsma G., Westerink B. H. C., De Boer P. y De Vries J. B. (1988) Basal acetylcholine release in freely moving rats detected by on-line trans-striatal dialysis: pharmacological aspects. *Life Sci.* 43, 1161-1168.
- Damsma G. y Westerink B. H. C. (1991) A microdialysis and automated on-line analysis approach to study central cholinergic transmission in vivo, en *Microdialysis in the Neurosciences*, (Robinson T. E. y Justice J. B., eds), pp. 237-252. Elsevier, Amsterdam.
- Dawson R., Jr., Wallace D. R. y Meldrum M. J. (1989) Endogenous glutamate release from frontal cortex of adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* 10, 665-668.
- Day J., Damsma G. y Fibiger H. C. (1991) Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38, 723-729.
- Day J. C., Kornecook T. J. y Quirion R. (2001) Application of *in vivo* microdialysis to the study of cholinergic systems. *Methods* 23, 21-39.
- Day J. C., Piazza P. V., Le Moal M. y Maccari S. (1997) Cocaine-induced increase in cortical acetylcholine release: interaction with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1130-1136.
- Dazzi L., Spiga F., Pira L., Ladu S., Vacca G., Rivano A., Jentsch D. y Biggio G. (2001a) Inhibition of stress- or anxiogenic-drug-induced increases in dopamine release in the rat prefrontal cortex by long-term treatment with antidepressant drugs. *J. Neurochem.* 76, 1212-1220.
- Dazzi L., Vacca G., Ladu S., Pisu M. Ga., Serra M. y Biggio G. (2001b) Long-term treatment with antidepressant drugs reduces the sensitivity of cortical cholinergic neurons to the activating actions of stress and the anxiogenic drug FG 7142. *Neuropharmacology* 41, 229-237.
- De Bruin J. P. C. (1990) Social behaviour and the prefrontal cortex, en *The prefrontal cortex: its structure, function and pathology*, (Uylings H. B. M., Van Eden C. G., De Bruin J. P. C., Corner M. A. y Feenstra M. G. P., eds), pp. 485-497. Elsevier, Amsterdam.
- De Felipe J. y Fariñas F. (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* 39, 563-607.
- de Groote L. y Linthorst A. C. E. (2007) Exposure to novelty and forced swimming evoke stressor-dependent changes in extracellular GABA in the rat hippocampus. *Neuroscience* 148, 794-805.
- de Kloet E. R. (2000) Stress in the brain. *Eur. J. Pharmacol.* 405, 187-198.

- de Kloet E. R., Joëls M. y Holsboer F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463-475.
- de Kloet E. R., Karst H. y Joëls M. (2008) Corticosteroid hormones in the central stress response. Quick-and-slow. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 268-272.
- de Kloet E. R., Oitzl M. S. y Joëls M. (1999) Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* 22, 422-426.
- DeBoer P., Westerink B. H. C. y Horn A. S. (1990) The effect of acetylcholinesterase inhibition on the release of acetylcholine from striatum in vivo: interaction with autoreceptor responses. *Neurosci. Lett.* 116, 357-360.
- Decker M. W. (1987) The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain Res. Rev.* 12, 423-438.
- Decker M. W. y McGaugh J. L. (1991) The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* 7, 151-168.
- Degroot A., Wolff M. C. y Nomikos G. G. (2004) Acute exposure to a novel object during consolidation enhances cognition. *NeuroReport* 16, 63-67.
- Del Arco A., Segovia G. y Mora F. (2001) Dopamine release during stress in the prefrontal cortex of the rat decreases with age. *NeuroReport* 12, 4019-4022.
- Del Arco A. y Mora F. (2001) Dopamine release in the prefrontal cortex during stress is reduced by the local activation of glutamate receptors. *Brain Res. Bull.* 56, 125-130.
- Del Arco A., Segovia G., Fuxe K. y Mora F. (2003) Changes of dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J. Neurochem.* 85, 23-33.
- Del Arco A., Segovia G., Canales J. J., Garrido P., De Blas M., García-Verdugo J. M. y Mora F. (2007a) Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *J. Neural Transm.* 114, 43-48.
- Del Arco A., Segovia G., Garrido P., De Blas M. y Mora F. (2007b) Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: Studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav. Brain Res.* 176, 267-273.
- Del Arco A., Mora F., Mohammed A. H. y Fuxe K. (2007c) Stimulation of D2 receptors in the prefrontal cortex reduces PCP-induced hyperactivity, acetylcholine release and dopamine metabolism in the nucleus accumbens. *J. Neural Transm.* 114, 185-193.
- Del Arco A., Segovia G. y Mora F. (2008) Blockade of NMDA receptors in the prefrontal cortex increases dopamine and acetylcholine release in the nucleus accumbens and motor activity. *Psychopharmacology* 201, 325-338.
- Descarries L., Gisiger V. y Steriade M. (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 53, 603-625.

- Descarries L., Séguéla P. y Watkins K. C. (1991) Nonjunctional relationships of monoamine axon terminals in the cerebral cortex of adult rat, in *Volume transmission in the brain*, (Fuxe K. y Agnati L. F., eds), pp. 53-62. Raven Press, New York.
- Deutch A. Y. y Roth R. H. (1990) The determinants of stress-induced activation of the prefrontal cortical dopamine system, en *The prefrontal cortex: its structure, function and pathology*, (Uylings H. B. M., Van Eden C. G., De Bruin J. P. C., Corner M. A. y Feenstra M. G. P., eds), pp. 367-403. Elsevier, Amsterdam.
- Dewey S. L., Chaurasia C. S., Chen C., Volkow N. D., Clarkson F. A., Porter S. P., Straughter-Moore R. M., Alexoff D. L., Tedeschi D., Russo N. B., Fowler J. S. y Brodie J. D. (1997) GABAergic attenuation of cocaine-induced dopamine release and locomotor activity. *Synapse* 25, 393-398.
- Di Chiara G. (1990b) In vivo brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 116-121.
- Di Chiara G. (1990a) Brain dialysis of neurotransmitters: a commentary. *J. Neurosci.* 34, 29-34.
- Diamond D. M., Ingersoll N., Fleshner M. y Rose G. M. (1996) Psychological stress impairs spatial working memory: Relevance to electrophysiological studies of hippocampal function. *Behav. Neurosci.* 110, 661-672.
- Diamond M. C. (2001) Response of the brain to enrichment. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73, 211-218.
- Dias R. y Aggleton J. P. (2000) Effects of selective excitotoxic prefrontal lesions on acquisition of nonmatching- and matching-to-place in the T-maze in the rat: differential involvement of the prelimbic-infralimbic and anterior cingulate cortices in providing behavioural flexibility. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4457-4466.
- Dias R. y Honey R. C. (2002) Involvement of the rat medial prefrontal cortex in novelty detection. *Behav. Neurosci.* 498-503.
- Diorio D., Viau V. y Meaney M. J. (1993) The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J. Neurosci.* 13, 3839-3847.
- Droste S. K., Chandramohan Y. y Reul J. M. H. M. (2007) Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis mainly at the adrenal level. *Neuroendocrinology* 86, 26-37.
- Droste S. K., de Groote L., Lightman S. L., Reul J. M. H. M. y Linthorst A. C. E. (2009a) The ultradian and circadian rhythms of free corticosterone in the brain are not affected by gender: an in vivo microdialysis study in Wistar rats. *J. Neuroendocrinol.* 21, 132-140.
- Droste S. K., Collins A., Lightman S. L., Linthorst A. C. E. y Reul J. M. H. M. (2009b) Distinct time-dependent effects of voluntary exercise on circadian and ultradian rhythms and stress responses of free corticosterone in the rat hippocampus. *Endocrinology* doi:10.1210/en.2009-0402,

- Dudchenko P. A. (2004) An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 699-709.
- Dunnett S. B., Everitt B. J. y Robbins T. W. (1991) The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci.* 14, 494-500.
- D'Esposito M. (2007) From cognitive to neural models of working memory. *Phil. Trans. R. Soc. B* 362, 761-772.
- Ebinger P. (1995) Domestication and plasticity of brain organization in mallards (*Anas platyrhynchos*). *Brain Behav. Evol.* 45, 286-300.
- Ekstrand J., Hellsten J. y Tingström A. (2008) Environmental enrichment, exercise and corticosterone affect endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus and prefrontal cortex. *Neurosci. Lett.* 442, 203-207.
- Elliott B. M. y Grunberg N. F. (2005) Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behav. Brain Res.* 165, 187-196.
- Emerich D. F., McDermott P., Krueger P., Banks M., Zhao J., Marszalkowski J., Frydel B., Winn S. R. y Sanberg P. R. (1993) Locomotion of aged rats: relationship to neurochemical but not morphological changes in nigrostriatal dopaminergic neurons. *Brain Res. Bull.* 32, 477-486.
- Erickson K. I., Colcombe S. J., Wadhwa R., Bherer L., Peterson M. S., Scalf P. E., Kim J. S., Alvarado M. y Kramer A. F. (2007) Training-induced plasticity in older adults: Effects of training on hemispheric asymmetry. *Neurobiol. Aging* 28, 272-283.
- Everitt A. y Meites J. (1989) Aging and antiaging effects of hormones. *J. Gerontol.* 44, B139-147.
- Falkenberg T., Mohammed A. H., Henriksson B., Persson H., Winblad B. y Lindefors N. (1992) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci. Lett.* 138, 153-156.
- Faroqui A. A. y Horrocks L. A. (1991) Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res. Rev.* 16, 171-191.
- Feenstra M. G. P., Botterblom M. H. A. y van Uum J. F. M. (1995) Novelty-induced increase in dopamine release in the rat prefrontal cortex in vivo: inhibition by diazepam. *Neurosci. Lett.* 189, 81-84.
- Feenstra M. G. P., Botterblom M. H. A. y van Uum J. F. M. (1998) Local activation of metabotropic glutamate receptors inhibits the handling-induced increased release of dopamine in the nucleus accumbens but not that of dopamine or noradrenaline in the prefrontal cortex: comparison with inhibition of ionotropic receptors. *J. Neurochem.* 70, 1104-1113.

Ferchmin P. A. y Bennett E. L. (1975) Direct contact with enriched environment is required to alter cerebral weights in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 88, 360-367.

Fernández C. I., Collazo J., Bauza Y., Castellanos M. R. y López A. (2004) Environmental enrichment-behavior-oxidative stress interactions in the aged rat. *Ann. NY Acad. Sci.* 1019, 53-57.

Fernández-Teruel A., Escorihuela R. M., Castellano B., González B. y Tobeña A. (1997) Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behavior Genetics* 27, 513-526.

Finch C. E. (1993) Neuron atrophy during aging: programmed or sporadic. *Trends Neurosci.* 16, 104-110.

Finlay J. M., Zigmond M. J. y Abercrombie E. D. (1995) Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience* 64, 619-628.

Fischer W., Nilsson O. G. y Björklund A. (1991) In vivo acetylcholine release as measured by microdialysis is unaltered in the hippocampus of cognitively impaired aged rats with degenerative changes in the basal forebrain. *Brain Res.* 556, 44-52.

Fischer W., Chen K. S., Gage F. H. y Björklund A. (1992) Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging. *Neurobiol. Aging* 13, 9-23.

Fischer A., Sananbenesi F., Wang X., Dobbin M. y Tsai L. (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178-182.

Floresco S. B. y Magyar O. (2006) Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology* 188, 567-585.

Fone K. C. F. y Porkess M. V. (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents--Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci & Biobehav Rev* 32, 1082-1102.

Fonnum F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42, 1-11.

Fox C., Merali Z. y Harrison C. (2006) Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav. Brain Res.* 175, 1-8.

Francis D. D., Diorio J., Plotsky P. M. y Meaney M. J. (2002) Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J. Neurosci.* 22, 7840-7843.

Freeman K., Lin P., Lin L. y Blank C. L. (2003) Monoamines and metabolites in the brain, en *High performance liquid chromatography in neuroscience research*, (Holman R. B., Cross A. J. y Joseph M. H., eds), pp. 25-54. John Wiley & Sons, Chichester (England).

- Frick K. M. y Fernandez S. M. (2003) Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol. Aging* 24, 615-626.
- Fuster J. M. (1997) *The prefrontal cortex. Anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe*. Lippincott-Raven, New York.
- Fuster J. M. (2009) *The Prefrontal Cortex*. Academic Press, London.
- Fuster J. M. (2000) Executive frontal functions. *Exp. Brain. Res.* 133, 66-70.
- Gagné J., Gélinas S., Martinoli M. G., Foster T. C., Ohayon M., Thompson R. F., Baudry M. y Massicotte G. (1998) AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment. *Brain Res.* 799, 16-25.
- Ganz M. (2005) Educating the brain to avoid dementia: can mental exercise prevent Alzheimer disease? *PLoS Medicine* 2, 38-40.
- Garner J. P. (2005) Stereotypes and other abnormal repetitive behaviors: potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. *ILAR Journal* 46, 106-117.
- Gerhardt G. A. y Maloney R. E. (1999) Microdialysis studies of basal levels and stimulus-evoked overflow of dopamine and metabolites in the striatum of young and aged Fischer 344 rats. *Brain Res.* 816, 68-77.
- Giovannini M. G., Bartolini L., Kopf S. R. y Pepeu G. (1998) Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. *Brain Res.* 784, 218-227.
- Giovannini M. G., Rakovska A., Benton R. S., Pazzagli M., Bianchi L. y Pepeu G. (2001) Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience* 106, 43-53.
- Godefroy F., Bassant M. H., Lamour Y. y Weil-Fugazza J. (1991) Effect of aging on dopamine metabolism in the rat cerebral cortex: a regional analysis. *J. Neural Transm.* 83, 13-24.
- Goel N. y Bale T. L. (2009) Examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders. *J. Neuroendocrinol.* 21, 415-420.
- Goldman-Rakic P. S. (1995) Cellular basis of working memory. *Neuron* 14, 477-485.
- Goldman-Rakic P. S. (1996) Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13473-13480.
- Goldman-Rakic P. S. (1998) The cortical dopamine system: role in memory and cognition. *Adv. Pharmacol.* 42, 707-711.
- Goldman-Rakic P. S., Muly III E. C. y Williams G. V. (2000) D1 receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res. Rev.* 31, 295-301.
- Goldstein L. E., Rasmusson A. M., Bunney B. S. y Roth R. H. (1996) Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J. Neurosci.* 16, 4787-4798.

- Gonzales R. A., Brown L. M., Jones T. W., Trent R. D., Westbrook S. L. y Leslie S. W. (1991) N-methyl-D-aspartate mediated responses decrease with age in Fischer 344 rat brain. *Neurobiol. Aging* 12, 219-225.
- Gooney M., Messaoudi E., Maher F. O., Bramham C. R. y Lynch M. A. (2004) BDNF-induced LTP in dentate gyrus is impaired with age: analysis of changes in cell signaling events. *Neurobiol. Aging* 25, 1323-1331.
- Goto Y., Otani S. y Grace A. A. (2007) The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. *Neuropharmacology* 53, 583-587.
- Gotti C., Moretti M., Gaimarri A., Zanardi A., Clementi F. y Zoli M. (2007) Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochem. Pharmacol.* 74, 1102-1111.
- Goudsmit E., Feenstra M. G. P. y Swaab D. F. (1990) Central monoamine metabolism in the male brown-Norway rat in relation to aging and testosterone. *Brain Res. Bull.* 25, 755-763.
- Gourley S. L., Kedves A. T., Olausson P. y Taylor J. R. (2008) A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3 and BDNF. *Neuropsychopharmacology* 34, 707-716.
- Grace A. A., Floresco S. B., Goto Y. y Lodge D. (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci.* 30, 220-227.
- Green A., Cain E., Michael T. y Bardo M. T. (2003) Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacology* 170, 235-241.
- Green T. A., Alibhai I. N., Roybal C. N., Winstanley C. A., Theobald D. E., Birnbaum S. G., Graham A. R., Unterberg S., Graham D. L., Vialou V., Bass C. E., Terwilliger E. F., Bardo M. T. y Nestler E. (2010) Environmental enrichment produces a behavioral phenotype mediated by low cyclic adenosine monophosphate response element binding (CREB) activity in the nucleus accumbens. *Biol. Psychiatry* 67, 28-35.
- Greenough W. T., McDonald J. W., Parnisari R. M. y Camel J. E. (1986) Environmental conditions modulate degeneration and new dendrite growth in cerebellum of senescent rats. *Brain Res.* 380, 136-143.
- Gurden H., Takita M. y Jay T. M. (2000) Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses *in vivo*. *J. Neurosci.* 20, 1-5.
- Haier R. J., Siegel Jr B. V., MacLachlan A., Soderling E., Lottenberg S. y Buchsbaum M. S. (1992) Regional glucose metabolic changes after learning a complex visuospatial/motor task: a positron emission tomographic study. *Brain Res.* 570, 134-143.
- Hains A. B. y Arnsten A. F. T. (2008) Molecular mechanisms of stress-induced prefrontal cortical impairment: Implications for mental illness. *Learn. Mem.* 15, 551-564.

- Handa R. J., Burgess L. H., Kerr J. E. y O'Keefe J. A. (1994) Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav* 28, 464-476.
- Harati H., Majchrzak M., Cosquer B., Galani R., Kelche C., Cassel J. C. y Barbelivien A. (2009) Attention and memory in aged rats: Impact of lifelong environmental enrichment. *Neurobiol. Aging* doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.03.012
- Harburger L. L., Lambert T. J. y Frick K. M. (2007) Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behav. Brain Res.* 185, 43-48.
- Hardingham G. E. y Bading H. (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci.* 26, 81-89.
- Harrington J., Perry I. J., Lutonski J., Fitzgerald A. P., Shiely F., McGee H., Barry M. M., Van Lente E., Morgan K. y Shelley E. (2009) Living longer and feeling better: healthy lifestyle, self-rated health, obesity and depression in Ireland. *Eur J Publ Health* 20, 91-95.
- Hassan A. H. S., Patchev V. K., von Rosenstiel P., Holsboer F. y Almeida O. F. (1999) Plasticity of hippocampal corticosteroid receptors during aging in the rat. *FASEB J.* 13, 115-122.
- Haug H. y Eggers R. (1991) Morphometry of the human cortex cerebri and corpus striatum during aging. *Neurobiol. Aging* 12, 336-338.
- Hayashi M., Mistunaga F., Ohira K. y Shimizu K. (2001) Changes in BDNF-immunoreactive structures in the hippocampal formation of the aged macaque monkey. *Brain Res.* 918, 191-196.
- Haydon P. G. (2001) Glia: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185-193.
- Hebert M. A. y Gerhardt G. A. (1997) Behavioral and neurochemical effects of intranigral administration of glial cell line-derived neurotrophic factor on aged Fischer 344 rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 760-768.
- Hedden T. y Gabrieli J. D. E. (2004) Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 87-96.
- Heinsbroek R. P. W., van Haaren F., Feenstra M. G. P., Boon P. y van de Poll N. E. (1991) Controllable and uncontrollable footshock and monoaminergic activity in the frontal cortex of male and female rats. *Brain Res.* 551, 247-255.
- Hellhammer D. H., Buchtal J., Gutberlet I. y Kirrschbaum C. (1997) Social hierarchy and adrenocortical stress reactivity in men. *Psychoneuroendocrinology* 22, 643-650.
- Helm K. A., Han J.-S. y Gallagher M. (2002) Effects of cholinergic lesions produced by infusions of 192 IgG-saporin on glucocorticoid receptor mRNA expression in hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience* 115, 765-774.

- Helm K. A., Ziegler D. R. y Gallagher M. (2004) Habituation to stress and dexamethasone suppression in rats with selective basal forebrain cholinergic lesions. *Hippocampus* 14, 628-635.
- Herbert J., Goodyer I. M., Grossman A. B., Hastings M. H., de Kloet E. R., Lightman S. L., Lupien S. J., Roozendaal B. y Seckl J. R. (2006) Do corticosteroids damage the brain? *J. Neuroendocrinol.* 18, 393-411.
- Herman J. P., Figueiredo H., Mueller N. K., Ulrich-Lai Y. M., Ostrander M. M., Choi D. C. y Cullinan W. E. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24, 151-180.
- Herman J. P., Ostrander M. M., Mueller N. K. y Figueiredo H. (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 29, 1201-1213.
- Herman J. P., Schäfer M. K. H., Young E. A., Thompson R., Douglass J., Akil H. y Watson S. J. (1989) Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamopituitary-adrenocortical axis. *J. Neurosci.* 9, 3072-3082.
- Hernandez L. F., Segovia G. y Mora F. (2006) Changes in dopamine and acetylcholine in striatum of the awake rat after chronic treatment with a dopamine uptake blocker. *Brain Res. Bull.* 68, 448-452.
- Hernández L. F., Segovia G. y Mora F. (2003) Effects of activation of NMDA and AMPA glutamate receptors on the extracellular concentrations of dopamine, acetylcholine and GABA in striatum of the awake rat: a microdialysis study. *Neurochem. Res.* 28, 1819-1827.
- Herzog C. D., Nowak K. A., Sarter M. y Bruno J. P. (2003) Microdialysis without acetylcholinesterase inhibition reveals an age-related attenuation in stimulated cortical acetylcholine release. *Neurobiol. Aging* 24, 861-863.
- Hibberd C., Yau J. L. W. y Seckl J. R. (2000) Glucocorticoids and the ageing hippocampus. *J. Anat.* 197, 553-562.
- Himmelheber A. M., Fadel J., Sarter M. y Bruno J. P. (1998) Effects of local cholinesterase inhibition on acetylcholine release assessed simultaneously in prefrontal and frontoparietal cortex. *Neuroscience* 86, 949-957.
- Hironaka N., Tanaka K., Izaki Y., Hori K. y Nomura M. (2001) Memory-related acetylcholine efflux from rat prefrontal cortex and hippocampus: a microdialysis study. *Brain Res.* 901, 143-150.
- Hoffmann L. C., Schette S. R. M., Koch M. y Schwabe K. (2009) Effect of "enriched environment" during development on adult rat behavior and response to the dopamine receptor agonist apomorphine. *Neuroscience* 158, 1589-1598.
- Hokfelt T., Ljungdahl A., Fuxe K. y Johansson O. (1974) Dopamine nerve terminals in the rat limbic cortex: aspects of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Science* 184, 177-179.

- Holmes M. C., Yau J. L. W., Kotelevtsev Y., Mullins J. J. y Seckl J. R. (2003) 11β -hydrosteroid dehydrogenases in the brain. *Ann. NY Acad. Sci.* 1007, 357-366.
- Holmes A. y Wellman C. L. (2009) Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 773-783.
- Huang R.-L., Wang C.-T., Tai M.-Y., Tsai Y.-F. y Peng M.-T. (1995) Effects of age on dopamine release in the nucleus accumbens and amphetamine-induced locomotor activity in rats. *Neurosci. Lett.* 200, 61-64.
- Hunt G. E., Van Nieuwenhuijzen P. S., Chan-Ling T. y McGregor I. S. (2009) "When an old rat smells a cat": A decline in defense-related, but not accessory olfactory, Fos expression in aged rats. *Neurobiol. Aging* doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.03.014.
- Igarashi E. y Takeshita S. (1995) Effects of illumination and handling upon rat open field activity. *Physiol. Behav.* 57, 699-703.
- Ikemoto S. y Goeders N. E. (1998) Microinjections of dopamine agonists and cocaine elevate plasma corticosterone: dissociation effects among the ventral and dorsal striatum and medial prefrontal cortex. *Brain Res.* 814, 171-178.
- Imperato A., Puglisi-Allegra S., Casolini P., Zocchi A. y Angelucci L. (1989) Stress-induced enhancement of dopamine and acetylcholine release in limbic structures: role of corticosterone. *Eur. J. Pharmacol.* 165, 337-338.
- Imperato A., Puglisi-Allegra S., Casolini P. y Angelucci L. (1991) Changes in brain dopamine and acetylcholine releases during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res.* 538, 111-117.
- Inglis F. M. y Fibiger H. C. (1995) Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. *Neuroscience* 66, 81-86.
- Issa A. M., Rowe W., Gauthier S. y Meaney M. J. (1990) Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J. Neurosci.* 10, 3247-3254.
- Iuvone L., Geloso M. C. y Dell'Anna E. (1996) Changes in open field behavior, spatial memory, and hippocampal parvalbumin immunoreactivity following enrichment in rats exposed to neonatal anoxia. *Exp. Neurol.* 139, 25-33.
- Iversen S. D. (1971) The effect of surgical lesions to frontal cortex and substantia nigra on amphetamine responses in rats. *Brain Res.* 31, 295-311.
- Jacobs B., Schall M. y Scheibel A. B. (1993) A quantitative dendritic analysis of Wernicke's area in humans. II. Gender, hemispheric, and environmental factors. *J. Comp. Neurol.* 327, 97-111.
- Jacobson L. y Sapolsky R. (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.* 12, 118-134.

- Jacobson L., Zhang R., Elliffe D., Chen K. F., Mathai S., McCarthy D., Waldvogel H. y Guan J. (2008) Correlation of cellular changes and spatial memory during aging in rats. *Exp. Gerontol.* 43, 929-938.
- Jane D. E., Lodge D. y Collingridge G. L. (2009) Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potencial. *Neuropharmacology* 56, 90-113.
- Jöels M., Krugers H. y Karst H. (2008) Stress-induced changes in hippocampal function. *Prog. Brain Res.* 167, 3-15.
- Jonides J., Smith E. E., Koeppe R. A., Awh E., Minoshima S. y Mintum M. A. (1993) Spatial working memory in humans as revealed by PET. *Nature* 363, 623-625.
- Justice J. B. (1993) Quantitative microdialysis of neurotransmitters. *J. Neurosci. Methods* 48, 263-276.
- Kalsbeek A. (1989) *Dopamine and the development of the rat prefrontal cortex*. Netherlands Institute for Brain Research, Amsterdam.
- Kametani H., Iijima S., Spangler E. L., Ingram D. K. y Joseph J. A. (1995) *In vivo* assessment of striatal dopamine release in the aged male Fischer 344 rat. *Neurobiol. Aging* 16, 639-646.
- Kant G. J., Lenox R. H., Bunnell B. N., Mougey E. H., Pennington L. L. y Meyerhoff J. L. (1983) Comparison of stress response in male and female rats: pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology* 8, 421-428.
- Kempermann G., Georg Kuhn H. y Gage F. H. (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci.* 18, 3206-3212.
- Kempermann G., Georg Kuhn H. y Gage F. H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.
- Kihlslinger R. L. y Nevitt G. A. (2006) Early rearing environment impacts cerebellar growth in juvenile salmon. *The Journal of Experimental Biology* 209, 504-509.
- Kikusui T., Tonohiro T. y Kaneko T. (1999) Age-related working memory deficits in the allocentric place discrimination task: possible involvement in cholinergic dysfunction. *Neurobiol. Aging* 20, 629-636.
- Kim J. J. y Diamond D. M. (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 453-462.
- Kissinger P. T., Hart J. B. y Adams R. N. (1973) Voltammetry in brain tissue - a new neurophysiological measurement. *Brain Res.* 55, 209-213.
- Kitchener P., Di Blasi F., Borrelli E. y Piazza P. V. (2004) Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1837-1846.

- Klein S. L., Lambert K. G., Durr D., Schaefer T. y Waring R. E. (1994) Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. *Physiol. Behav.* 56, 291-297.
- Kolb B., Gorny G., Söderpalm A. H. V. y Robinson T. E. (2003) Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex *versus* the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse* 48, 149-153.
- Kolb B. y Whishaw I. Q. (1998) Brain plasticity and behavior. *Ann. Rev. Psychol.* 49, 43-64.
- Komitova M., Perfilieva E., Mattson B., Eriksson P. S. y Johansson B. (2006) Enriched environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive polydendrocytes in adult rat neocortex. *Exp. Neurol.* 199, 113-121.
- Kozak R., Bruno J. P. y Sarter M. (2005) Augmented prefrontal acetylcholine release during challenged attentional performance. *Cereb. Cortex.*
- Kramer A. F., Bherer L., Colcombe S., Dong W. y Greenough W. T. (2004) Environmental influences on cognitive and brain plasticity during aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59, M940-957.
- Kudielka B. M., Schmidt-Reinwald A. K., Hellhammer D. H., Schürmeyer T. y Kirschbaum C. (2000) Psychosocial Stress and HPA Functioning: No Evidence for a Reduced Resilience in Healthy Elderly Men. *Stress* 3, 229-240.
- Kuhar M. J., Couceyro P. R. y Lambert P. D. (1999) Catecholamines, en *Basic Neurochemistry*, (Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Fisher S. K. y Uhler M. D., eds), pp. 243-262. Lippincott.-Raven, Philadelphia.
- Kuhn H. G., Dickinson-Anson H. y Gage F. H. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027-2033.
- Kukolja J., Thiel C. M., Wolf O. T. y Fink G. R. (2008) Increased cortisol levels in cognitively challenging situations are beneficial in young but not older subjects. *Psychopharmacology* 1-12.
- Kurosawa M., Sato A. y Sato Y. (1989a) Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases acetylcholine release in the cerebral cortex in rats. *Neurosci. Lett.* 98, 45-50.
- Kurosawa M., Sato A. y Sato Y. (1989b) Well-maintained responses of acetylcholine release and blood flow in the cerebral cortex to focal electrical stimulation of the nucleus basalis of Meynert in aged rats. *Neurosci. Lett.* 100, 198-202.
- Kuzumaki N., Ikegami D., Tamura R., Hareyama N., Imai S., Narita M., Torigoe K., Niikura K., Takeshima H., Ando T., Igarashi K., Kanno J., Ushijima T., Suzuki T. y Narita M. (2010) Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus* doi:10.1002/hipo.20775.

- Lada M. W., Vickroy T. W. y Kennedy R. T. (1998) Evidence for neuronal origin and metabotropic receptor-mediated regulation of extracellular glutamate and aspartate in rat striatum *in vivo* following electrical stimulation of the prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 70, 617-625.
- Lalonde R. (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 91-104.
- Landfield P. W. y Lynch G. (1978) Hippocampal aging and adrecorticoids: a quantitative correlation. *Science* 202, 1098-1102.
- Laplanche F., Stevenson C. W., Gratton A., Srivastava L. K. y Quirion R. (2004) Effects of neonatal ventral hippocampal lesion in rats on stress-induced acetylcholine release in the prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 91, 1473-1482.
- Larsson F., Winblad B. y Mohammed A. H. (2002) Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 193-207.
- Laviola G., Hannan A. J., Macrì S., Solinas M. y Jaber M. (2008) Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease* 31, 159-168.
- Le Marec N., Ethier K., Rompré P. P. y Godbout R. (2002) Involvement of the medial prefrontal cortex in two alternation tasks using different environments. *Brain Cogn.* 48, 432-436.
- Leal-Galicia P., Saldivar-González A., Morimoto S. y Arias C. (2007) Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: role of individual responsiveness to anxiety. *Dev. Neurobiol.* 67, 395-405.
- Leal-Galicia P., Castañeda-Bueno M., Quiroz-Baez R. y Arias C. (2008) Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 511-518.
- Lee J. M., Ross E. R., Gower A., Paris J. M., Martensson R. y Lorens S. A. (1994) Spatial learning deficits in the aged rat: neuroanatomical and neurochemical correlates. *Brain Res. Bull.* 33, 489-500.
- Lee E. H. Y., Hsu W. L., Ma Y. L., Lee P. J. y Chao C. C. (2003) Enrichment enhances the expression of *sgk*, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2842-2852.
- Leggio M. G., Mandolesi L., Federico F., Spirito F., Ricci B., Gelfo F. y Petrosini L. (2005) Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav. Brain Res.* 163, 78-90.
- Leng A., Feldon J. y Ferger B. (2004) Long-term social isolation and medial prefrontal cortex: dopaminergic and cholinergic neurotransmission. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77, 371-379.

- Lengvári I. y Liposits Z. S. (1977) Diurnal changes in endogenous corticosterone content of some brain regions of rats. *Brain Res.* 124, 571-575.
- Leonard C. M. (1972) The connections of the dorsomedial nuclei. *Brain Behav. Evol.* 6, 524-541.
- Leonard C. M. (1969) The prefrontal cortex of the rat: I. Cortical projections of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. *Brain Res.* 12, 321-343.
- Levine S. (2005) Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30, 939-946.
- Li L. y Tang L.H. (2005) Environmental enrichment and neurodegenerative diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 293-297.
- Lindroth P. y Mopper K. (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amount amino acids by precolumn fluorescence derivation with o-phthaldialdehyde. *Ann. Chem.* 51, 1667-1674.
- Lindvall O., Björklund A. y Dirac I. (1978) Organization of catecholamine neurons projecting to the frontal cortex in the rat. *Brain Res.* 142, 1-24.
- Linthorst A. C. E., Flachskamm C., Barden N., Holsboer F. y Reul J. M. H. M. (2000) Glucocorticoid receptor impairment alters CNS responses to a psychological stressor: an in vivo microdialysis study in transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.* 12, 283-291.
- Little H. J., Croft A. P., O'Callaghan M. J., Brooks S. P., Wang G. y Shaw S. G. (2008) Selective increases in regional brain glucocorticoid: a novel effect of chronic alcohol. *Neuroscience* 156, 1017-1027.
- Liu P., Jing Y. y Zhang H. (2009) Age-related changes in arginine and its metabolites in memory-associated brain structures. *Neuroscience* 164, 611-628.
- Liu X., Tang X. y Sanford L. D. (2009) Stressor controllability and Fos expression in stress regulatory regions in mice. *Physiol. Behav.* 97, 321-326.
- Locchi F., Dall'Olio R., Gandolfi O. y Rimondini R. (2007) Water T-maze, an improved method to assess spatial working memory in rats: Pharmacological validation. *Neurosci. Lett.* 422, 213-216.
- Lorens S. A., Hata R. J., Handa R. J., Van de Kar L. D., Gusechwan M., Goral J., Lee J. M., Hamilton M. E., Bethea C. L. y Clancy J. Jr. (1990) Neurochemical, endocrine and immunological responses to stress in young and old Fischer 344 male rats. *Neurobiol. Aging* 11, 139-150.
- Lores-Arnaiz S., Bustamante J., Arismendi M., Vilas S., Paglia N., Basso N., Capani F., Coirini H., López Costa J. J. y Lores-Arnaiz M. R. (2006) Extensive enriched environments protect old rats from the aging dependent impairment of spatial cognition, synaptic plasticity and nitric oxide production. *Behav. Brain Res.* 169, 294-302.

- Lu L., Bao G., Chen H., Xia P., Fan X., Zhang J., Pei G. y Ma L. (2003) Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp. Neurol.* 183, 600-609.
- Lucas-Meunier E., Fossier P., Baux G. y Amar M. (2003) Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Eur. J. Physiol.* 446, 17-29.
- Luine V., Bowling D. y Hearn M. (1990) Spatial memory deficits in aged rats: contributions of monoaminergic systems. *Brain Res.* 537, 271-278.
- Lupien S. J., de Leon M., de Santi M., Convit A., Tarsish C., Nair N. P. V., Thakur M., McEwen B. S., Hauger R. L. y Meaney M. J. (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat. Neurosci.* 1, 69-73.
- Lupien S. J., Maheu F., Tu M., Fiocco A. y Schramek T. E. (2007) The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn* 65, 209-237.
- Lupien S. J., McEwen B. S., Gunnar M. R. y Heim C. (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behavior and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 434-444.
- Lutz W., Sanderson W. y Scherbov S. (2008) The coming acceleration of global population ageing. *Nature* 451, 716-719.
- Magariños A. M., Somoza G. y De Nicola A. F. (1987) Glucocorticoid negative feedback and glucocorticoid receptors after hippocampectomy in rats. *Horm Metab Res* 19, 105-109.
- Magnusson K. R. y Cotman C. W. (1993a) Effects of aging on NMDA and MK801 binding sites in mice. *Brain Res.* 604, 334-337.
- Magnusson K. R. y Cotman C. W. (1993b) Age-related changes in excitatory amino acid receptors in two mouse strains. *Neurobiol. Aging* 14, 197-206.
- Magnusson K. R. (1998) Aging of glutamate receptors: correlations between binding and spatial memory performance in mice. *Mech. Ageing Dev.* 104, 227-48.
- Maguire E. A., Gadian D. G., Johnsrude I. S., Good C. D., Ashburner J., Frackowiak R. S. y Frith C. D. (2000) Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4398-4403.
- Mahncke H. W., Bronstone A. y Merzenich M. M. (2006) Brain plasticity and functional losses in the aged: scientific bases for a novel intervention, en *Reprogramming of the Brain. Prog. Brain Res. Vol 157*, (Aage R. M., ed), pp. 81-109. Elsevier, Amsterdam.
- Maier S. F., Amat J., Baratta M. V., Paul E. y Watkins L. R. (2006) Behavioral control, the medial prefrontal cortex, and resilience. *Dialogues Clin Neurosci* 8, 397-406.

- Majdi M., Ribeiro-da-Silva A. y Cuello A. C. (2009) Variations in excitatory and inhibitory postsynaptic protein content in rat cerebral cortex with respect to aging and cognitive status. *Neuroscience* 159, 896-907.
- Makman M. H. (1993) Influence of normal aging on monoamines, monoamine receptors and associated signal transduction systems, en *Neuroregulatory mechanisms in aging*, (Makman M. H. y Stefano G. B., eds), pp. 47-78. Pergamon Press, Oxford.
- Malberg J. E. (2004) Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *Rev. Psychiatr. Neurosci* 29, 196-205.
- Marashi V., Barnekow A., Ossendorf E. y Sachser N. (2003) Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological and immunological parameters in male mice. *Horm. Behav.* 43, 281-292.
- Mark G. P., Rada P. V. y Shors T. J. (1996) Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala. *Neuroscience* 74, 767-774.
- Markham J. A. y Greenough W. T. (2004) Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse. *Neuron Glia Boil.* 1, 351-363.
- Martín R., Ladera C., Bartolomé-Martín D., Torres M. y Sánchez-Prieto J. (2008) The inhibition of release by mGluR7 receptors is independent of the Ca^{2+} channel type but associated to GABA_B and adenosine A₁ receptors. *Neuropharmacology* 55, 464-473.
- Mason B. L., Pariente C. M. y Thomas S. A. (2008) A revised role for P-glycoprotein in the brain distribution of dexamethasone, cortisol, and corticosterone in wild-type and ABCB1A/B-deficient mice. *Endocrinology* 149, 5244-5253.
- Mattsson A., Örgren S. O. y Olson L. (2002) Facilitation of dopamine-mediated locomotor activity in adult rats following cholinergic denervation. *Exp. Neurol.* 174, 96-108.
- McEwen B. S. (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 886, 172-189.
- McEwen B. S., de Kloet E. R. y Rostene W. (1986) Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. Rev.* 66, 1121-1188.
- McIntosh F. C. y Oborin P. E. (1953) Release of acetylcholine from intact cerebral cortex. *Abstracts of Communications, XIX International Physiological Congress* 580-581.
- McOmish C. E. y Hannan A. J. (2007) Enviromimetics: exploring gene environment interactions to identify therapeutic targets for brain disorders. *Expert Opin Ther Targets* 11, 899-913.
- Meaney M. J., Aitken D. H., Sharma S. y Viau V. (1992) Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 55, 204-213.

- Meaney M. J. y Aitken D. H. (1985) [3H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex. *Brain Res.* 328, 176-180.
- Meijer O. C., Kortekaas R., Oitzl M. S. y de Kloet E. R. (1998) Acute rise in corticosterone facilitates 5-HT receptor-mediated behavioural responses. *Eur. J. Pharmacol.* 351, 7-14.
- Meijer O. C., Topic B., Steenbergen G., Jocham G., Houston J. P. y Oitzl M. S. (2005) Correlations between hypothalamus-pituitary-adrenal axis parameters depend on age and learning capacity. *Endocrinology* 146, 1372-1381.
- Meites J. (1988) Neuroendocrine biomarkers of aging in the rat. *Exp. Gerontol.* 23, 349-358.
- Meléndez R. I., Gregory M. L., Bardo M. T. y Kalivas P. W. (2004) Impoverished rearing environment alters metabotropic glutamate receptor expression and function in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 29, 1980-1987.
- Meshi D., Drew M. R., Saxe M., Ansorge M. S., David D., Santarelli L., Malapani C., Moore H. y Hen R. (2006) Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat. Neurosci.* 9, 729-731.
- Miele M., Boutelle M. G. y Fillenz M. (1996) The source of physiologically stimulated glutamate efflux from the striatum of conscious rats. *J. Physiol.* 497, 745-751.
- Míguez J. M., Aldegunde M., Paz-Valiñas L., Recio J. y Sánchez-Barceló E. (1999) Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *J. Neural Transm.* 106, 1089-1098.
- Milgram N. W., Siwak-Tapp C. T., Araujo J. y Head E. (2006) Neuroprotective effects of cognitive enrichment. *Ageing Res. Rev.* 5, 354-369.
- Mirescu C. y Gould E. (2006) Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16, 233-238.
- Mirmiran M., Van Gool W. A., Van Haaren F. y Polak C. E. (1986) Environmental influences on brain and behavior in aging and Alzheimer's disease, en *Aging of the brain and alzheimer's disease. Prog. Brain Res.. Vol. 70*, (Swaab D. F., Fliers E., Mirmiran M., Van Gool W. A. y Van Haaren F., eds), pp. 443-459. Elsevier, Amsterdam.
- Mitala C. M., Wang Y., Borland L. M., Jung M., Shand S., Watkins S., Weber S. G. y Michael A. C. (2008) Impact of microdialysis probes on vasculature and dopamine in the rat striatum: a combined fluorescence and voltammetric study. *J. Neurosci. Methods* 174, 177-185.
- Mitsushima D., Mizuno T. y Kimura F. (1996) Age-related changes in diurnal acetylcholine release in the prefrontal cortex of male rats as measured by microdialysis. *Neuroscience* 72, 429-434.
- Miura H., Qiao H. y Ohta T. (2002) Influence of aging and social isolation on changes in brain monoamine turnover and biosynthesis of rats elicited by novelty stress. *Synapse* 46, 116-124.

- Miyamoto J. K., Uezu E. y Terashima S. (1991) Active transport pumps of HVA and DOPAC in dopaminergic nerve terminals. *Physiol. Behav.* 49, 141-147.
- Mizoguchi K., Ishige A., Takeda S., Aburada M. y Tabira T. (2004) Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *J. Neurosci.* 24, 5492-5499.
- Mizoguchi K., Shoji H., Ikeda R., Tanaka Y., Maruyama W. y Tabira T. (2008) Suppression of glucocorticoid secretion enhances cholinergic transmission in rat hippocampus. *Brain Res. Bull.* 76, 612-615.
- Mizoguchi K., Ikeda R., Shoji H., Tanaka Y., Maruyama W. y Tabira T. (2009a) Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience* 159, 259-270.
- Mizoguchi K., Shoji H., Tanaka Y., Maruyama W. y Tabira T. (2009b) Age-related spatial working memory impairment is caused by prefrontal cortical dopaminergic dysfunction in rats. *Neuroscience* 162, 1192-1201.
- Mizuno T. y Kimura F. (1997) Attenuated stress response of hippocampal acetylcholine release and adrenocortical secretion in aged rats. *Neurosci. Lett.* 222, 49-52.
- Mlynarik M., Johansson B. B. y Jezova D. (2004) Enriched environment influences adrenocortical response to immune challenge and glutamate receptor gene expression in rat hippocampus. *Ann. NY Acad. Sci.* 1018, 273-280.
- Moghaddam B. (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J. Neurochem.* 60, 1650-1657.
- Moghaddam B., Bolinao M. L., Stein-Behrens B. y Sapolsky R. M. (1994) Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res.* 655, 251-254.
- Mohajeri M. H. y Leuba G. (2009) Prevention of age-associated dementia. *Brain Res. Bull.* 80, 315-325.
- Moncek F., Duncko R., Johansson B. B. y Jezova D. (2004) Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J. Neuroendocrinol.* 16, 423-431.
- Montaron M. F., Drapeau E., Dupret D., Kitchener P., Aurousseau C., Le Moal M., Piazza P. V. y Abrous D. N. (2006) Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol. Aging* 27, 645-654.
- Moore H., Sarter M. y Bruno J. P. (1992) Age-dependent modulation of *in vivo* cortical acetylcholine release by benzodiazepine receptor ligands. *Brain Res.* 596, 17-29.
- Moore H., Stuckman S., Sarter M. y Bruno J. P. (1996) Potassium, but not atropine-stimulated cortical acetylcholine efflux, is reduced in aged rats. *Neurobiol. Aging* 17, 565-571.
- Mora F. y Myers R. D. (1977) Brain self-stimulation: direct evidence for the involvement of dopamine in the prefrontal cortex. *Science* 197, 1387-1389.

- Mora F. y Ferrer J. M. R. (1986) Neurotransmitters, pathways and circuits as the neural substrates of self-stimulation of the prefrontal cortex: facts and speculations. *Behav. Brain Res.* 22, 127-140.
- Mora F. y Cobo M. (1990) The neurobiological bases of prefrontal cortex self-stimulation: a review and an integrative hypothesis, en *The prefrontal cortex: its function, structure and pathology*, (Uylings H. B. M., Van Eden C. G., De Bruin J. P. C., Corner M. A. y Feenstra M. G. P., eds), pp. 409-431. Elsevier, Amsterdam.
- Mora F. y Porras A. (1998) Procesos involutivos del sistema nervioso, en *Manual de Neurociencia*, (Delgado J. M., Ferrús A., Mora F. y Rubia F., eds), pp. 915-927. Síntesis, Madrid.
- Mora, F. (2000) Genes, medio ambiente y cerebro, en *Constitución genética y factores ambientales en medicina*, (Segovia J.M. y Mora F., coordinadores) pp 25-32. Farmaindustria, Madrid.
- Mora F., Segovia G. y Del Arco A. (2008) Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res. Rev.* 58, 340-353.
- Mora F., Segovia G. y Del Arco A. (2007) Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res. Rev.* 55, 78-88.
- Morelli M., Mennini T., Cagnotto A., Toffano G. y Di Chiara G. (1990) Quantitative autoradiographical analysis of the age-related modulation of central dopamine D1 and D2 receptors. *Neuroscience* 36, 403-410.
- Morelli M., Fenu S., Cozzolino A. y Di Chiara G. (1991) Positive and negative interactions in the behavioural expression of D1 and D2 receptor stimulation in a model of parkinsonism: role of priming. *Neuroscience* 42, 41-48.
- Morris J. C. (2002) Challenging assumptions about Alzheimer's disease: mild cognitive impairment and the cholinergic hypothesis. *Ann. Neurol.* 51, 143-144.
- Morrison J. H. y Hof P. R. (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278, 412-419.
- Morrow B. A., Roth R. H. y Elsworth J. D. (2000) TMT, a predator odor, elevates mesoprefrontal dopamine metabolic activity and disrupts short-term working memory in the rat. *Brain Res. Bull.* 52, 519-523.
- Moser M., Trommald M., Egeleand T. y Andersen P. (1997) Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.* 380, 373-381.
- Müller M. B., Keck M. E., Blinder E. B., Kresse A. E., Hagameyer T. P., Landgraf R., Holsboer F. y Uhr M. (2003) ABCB1 (MDR1)-Type P-Glycoproteins at the blood-brain barrier modulate the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: implications for affective disorder. *Neuropsychopharmacology* 28, 1991-1999.

- Murphy B. L., Arnsten A. F. T., Goldman-Rakic P. S. y Roth R. H. (1996) Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1325-1329.
- Musazzi L., Milanese M., Farisello P., Zappettini S., Tardito D., Barbiero V. S., Bonifacino T., Mallei A., Baldelli P., Racagni G., Raiteri M., Benfenati F., Bonanno G. y Popoli P. (2010) Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS ONE* 5, 1-11.
- Myers R. D. (1986) Development of push-pull systems for perfusion of anatomically distinct regions of the brain of the awake animal, en *Neurochemical analysis of the conscious brain: voltammetry and push-pull perfusion*, (Myers R. D. y Knott P., eds), pp. 21-41. Ann.N.Y.Acad.Sci. Vol. 473.
- Myhrer T., Utsikt L., Fjelland J., Iversen E. G. y Fonnum F. (1992) Differential rearing conditions in rats: Effects on neurochemistry in neocortical areas and cognitive behaviors. *Brain Res. Bull.* 28, 427-434.
- Naka F., Shiga T., Yaguchi M. y Okado N. (2002) An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Res.* 924, 124-126.
- Nelson C. L., Sarter M. y Bruno J. P. (2000) Repeated pretreatment with amphetamine sensitizes increases in cortical acetylcholine release. *Psychopharmacology* 151, 406-415.
- Neugebauer N. M., Cunningham S. T., Zhu J., Bryant R. I., Middleton L. S. y Dwoskin L. P. (2004) Effects of environmental enrichment on behavior and dopamine transporter function in medial prefrontal cortex in adult rats prenatally treated with cocaine. *Dev. Brain Res.* 153, 213-223.
- Newberry R. C. (1995) Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 44, 229-243.
- Nichols N. R., Zieba M. y Bye N. (2001) Do glucocorticoids contribute to brain aging? *Brain Res. Rev.* 37, 273-286.
- Nilsson M., Perfilieva E., Johansson U., Orwar O. y Eriksson P. S. (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J. Neurobiol.* 39, 569-578.
- Nilsson O. G., Leanza G. y Björklund A. (1992) Acetylcholine release in the hippocampus: regulation by monoaminergic afferents as assessed by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 584, 132-140.
- Nithianantharajah J. y Hannan A. J. (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 697-709.
- Nithianantharajah J. y Hannan A. J. (2009) The neurobiology of brain and cognitive reserve: Mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog. Neurobiol.* 89, 369-382.

Nyakas C., Buwalda B., Luiten P. G. M. y Bohus B. (1992) Effect of low amphetamine doses on cardiac responses to emotional stress in aged rats. *Neurobiol. Aging* 13, 123-129.

Oitzl M. S., Fluttert M. y de Kloet E. R. (1994) The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. *Eur. J. Neurosci.* 1072-1079.

Olsson I. A. S. y Dahlborn K. (2002) Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Lab Anim* 36, 243-270.

Olsson T., Mohammed A. H., Donaldson L. F., Henriksson B. G. y Seckl J. R. (1994) Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rats. *Mol. Brain Res.* 23, 349-353.

Otte C., Hart S., Neylan T. C., Marmar C. R., Yaffe K. y Mohr D. C. (2005) A meta-analysis of cortisol response to challenge in human aging: importance of gender. *Psychoneuroendocrinology* 30, 80-91.

Pacteau C., Einon D. y Sinden J. D. (1989) Early rearing environment and dorsal hippocampal ibotenic acid lesions: long term influences on spatial learning and alternation in the rat. *Behav. Brain Res.* 34, 79-96.

Pakdel R. y Rashidy-Pour A. (2007) Microinjections of the dopamine D2 receptor antagonist sulpiride into the medial prefrontal cortex attenuate glucocorticoid-induced impairment of long-term memory retrieval in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87, 385-390.

Parfitt K. D., Gratton A. y Bickford-Wimer P. C. (1990) Electrophysiological effects of selective D1 and D2 dopamine receptor agonists in the medial prefrontal cortex of young and aged Fischer 344 rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254, 539-545.

Parikh V. y Sarter M. (2008) Cholinergic mediation of attention: Contributions of phasic and tonic increases in prefrontal cholinergic activity. *Ann. NY Acad. Sci.* 1129, 225-235.

Park G. A. S., Pappas B. A., Murtha S. M. y Ally A. (1992) Enriched environment primes forebrain choline acetyltransferase activity to respond to learning experience. *Neurosci. Lett.* 143, 259-262.

Park C. R., Campbell A. M., Woodson J. C., Smith T. P., Fleshner M. y Diamond D. M. (2006) Permissive influence of the stress in the expression of a U-shaped relationship between serum corticosterone levels and spatial memory errors in rats. *Dose Response* 4, 55-74.

Park C. R., Zoladz P. R., Conrad C. D., Fleshner M. y Diamond D. M. (2008) Acute predator stress impairs the consolidation and retrieval of hippocampus-dependent memory in male and female rats. *Learn. Mem.* 15, 271-280.

Parker K. J., Buckmaster C. L., Schatzberg A. F. y Lyons D. M. (2006) Maternal mediation, stress inoculation, and the development of neuroendocrine stress resistance in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3000-3005.

Parnavelas J. G. (1990) Neurotransmitters in the cerebral cortex, en *The prefrontal cortex: its structure, function and pathology*, (Uylings H. B. M., Van Eden C. G., De Bruin J. P. C., Corner M. A. y Feenstra M. G. P., eds), pp. 13-30. Elsevier, Amsterdam.

Pasti L., Zonta M., Pozzan T., Vicini S. y Carmignoto G. (2001) Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J. Neurosci.* 21, 477-484.

Paxinos G. y Watson C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.

Peinado J. M., McManus K.-T. y Myers R. D. (1986) Rapid method for micro-analysis of endogenous amino acid neurotransmitters in brain perfusates in the rat by isocratic HPLC-EC. *J. Neurosci. Methods* 18, 269-276.

Peinado J. M. y Mora F. (1986) Glutamic acid as a putative transmitter of the interhemispheric corticocortical connections in the rat. *J. Neurochem.* 47, 1598-1603.

Peña Y., Prunell M., Rotllant D., Armario A. y Escorihuela R. M. (2009) Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1390-1404.

Pepeu G. y Giovannini M. G. (2007) Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes, en *Handbook of Microdialysis*, (Westerink B. H. C. y Cremers T. I. F. H., eds), pp. 377-398. Academic Press, London.

Pepeu G. y Giovannini M. G. (2004) Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learning and Memory* 11, 21-27.

Perea G., Navarrete M. y Araque A. (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421-431.

Perry J. L., Stairs D. J. y Bardo M. T. (2008) Impulsive choice and environmental enrichment: Effects of d-amphetamine and methylphenidate. *Behav. Brain Res.* 193, 48-54.

Petrosini L., De Bartolo P., Foti F., Gelfo F., Cutuli D., Leggio M. G. y Mandolesi L. (2009) On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Res. Rev.* doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.07.002.

Pham T. M., Winblad B., Granholm A.-C. y Mohammed A. H. (2002) Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 167-175.

Phillips A. G., Ahn S. y Floresco S. B. (2004) Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on delayed response task. *J. Neurosci.* 24, 547-553.

Piazza P. V., Rouge-Pont F., Deroche V., Maccari S., Simon H. y Le Moal M. (1996) Glucocorticoids have state-dependent stimulatory effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8716-8720.

- Pin J.P. y Duvoisin R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34, 1-26.
- Por S. B. y Bondy S. C. (1982) Environmental enrichment and neurotransmitter receptors. *Behav. Neural Biol.* 34, 132-140.
- Potter P., Meek N. y Neff N. (1983) Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection. *J. Neurochem.* 41, 188-194.
- Preuss T. M. (1995) Do rats have prefrontal cortex? The Rose-Woolsey-Akert program reconsidered. *J. Cogn. Neurosci.* 7, 1-24.
- Purdom M.S., Stanford J.A., Currier T.D., Gerhardt G.A. (2003), Microdialysis studies on D-amphetamine-evoked striatal dopamine overflow in young versus aged F344 rats: effects of concentration and order of administration. *Brain Res.* 979, 203-209.
- Radley J. J., Arias C. M. y Sawchenko P. E. (2006) Regional Differentiation of the Medial Prefrontal Cortex in Regulating Adaptive Responses to Acute Emotional Stress. *J. Neurosci.* 26, 12967-12976.
- Radley J. J., Gosselink K. L. y Sawchenko P. E. (2009) A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J. Neurosci.* 29, 7330-7340.
- Ragozzino M. E. (2002) The effects of dopamine D1 receptor blockade in the prelimbic-infralimbic areas on behavioral flexibility. *Learn. Mem.* 9, 18-28.
- Rajah M. N., Bastianetto S., Bromley-Britts K., Cools R., D'Esposito M., Grady C. L., Poirier J., Quirion R., Raz N., Rogaeva E., Song W. y Pruessner J. (2009) Biological changes associated with healthy versus pathological aging: A symposium review. *Ageing Res. Rev.* 8, 140-146.
- Ramos B. P. y Arnsten A. F. T. (2007) Adrenergic pharmacology and cognition: Focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol. Ther.* 113, 523-536.
- Rampon C., Tang Y.P., Goodhouse J., Shimizu E., Kyin M. y Tsien J. Z. (2000a) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* 3, 238-244.
- Rampon C., Jiang C. H., Dong H., Tang Y. P., Lockhart D. J., Schultz P. G., Tsien J. Z. y Hu Y. (2000b) Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12880-12884.
- Rao V. R. y Finkbeiner S. (2007) NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends Neurosci.* 30, 284-291.
- Rapp P. R. y Gallagher M. (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9926-9930.
- Rasmuson S., Olsson T., Henriksson B. G., Kelly P. A. T., Holmes M. C., Seckl J. R. y Mohammed A. H. (1998) Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A

receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Mol. Brain Res.* 53, 285-290.

Rasmussen T., Schliemann T., Sorensen J. C., Zimmer J. y West M. J. (1996) Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol. Aging* 17, 143-147.

Rea K., Cremers T. I. F. H. y Westerink B. H. C. (2005) HPLC conditions are critical for the detection of GABA by microdialysis. *J. Neurochem.* 94, 672-679.

Reul J. M. H. M. y de Kloet E. R. (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117, 2505-2511.

Revest J. M., Dupret D., Koehl M., Funk-Reiter C., Grosjean N. y Piazza P. V. (2009) Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Molecular Psychiatry* 14, 959-967.

Robbins T. W., Jones G. H. y Wilkinson L. S. (1996) Behavioural and neurochemical effects of early social deprivation in the rat. *Journal of Psychopharmacology* 10, 39-47.

Robbins T. W. (1997) Arousal systems and attentional processes. *Biol. Psychiatry* 45, 57-71.

Robbins T. W. (2005a) Chemistry of the mind: neurochemical modulation of prefrontal cortical function. *J. Comp. Neurol.* 493, 140-146.

Robbins T. W. (2005b) Controlling stress: how the brain protects itself from depression. *Nat. Neurosci.* 8, 261-262.

Robbins T. W. (2007) Shifting and stopping: fronto-striatal substrates, neurochemical modulation and clinical implications. *Phil. Trans. R. Soc. B* 362, 917-932.

Robbins T. W. y Roberts A. C. (2007) Differential Regulation of Fronto-Executive Function by the Monoamines and Acetylcholine. *Cereb. Cortex* 17, i151-i160.

Robinson T. E. y Justice J. B. (1991) *Microdialysis in the Neurosciences*. Elsevier, Amsterdam.

Rogóz Z., Kubera M., Rogóz K., Basta-Kaim A. y Budziszewska B. (2009) Effect of co-administration of fluoxetine and amantadine on immunoendocrine parameters in rats subjected to a forced swimming test. *Pharmacol. Rep.* 61, 1050-1060.

Romanides A. J., Duffy P. y Kalivas P. W. (1999) Glutamatergic and dopaminergic afferents to the prefrontal cortex regulate spatial working memory in rats. *Neuroscience* 92, 97-106.

Roozendaal B., Okuda S., De Quervain D. J. F. y McGaugh J. L. (2006) Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing defferent memory functions. *Neuroscience* 138, 901-910.

- Rosenblad C. y Nilsson G. E. (1993) Basal forebrain grafts in the rat neocortex restore in vivo acetylcholine release and respond to behavioural activation. *Neuroscience* 55, 353-362.
- Rosenzweig M. R. y Bennett E. L. (1996) Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain Res.* 78, 57-65.
- Rosenzweig M. R. (2003) Effects of Differential Experience on the Brain and Behavior. *Dev Neuropsychol.* 24, 523.
- Rosner W. (1990) The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin. *Endocr. Rev.* 11, 80-91.
- Rossetti Z. L. y Carboni S. (2005) Noradrenaline and dopamine elevations in the rat prefrontal cortex in spatial working memory. *J. Neurosci.* 25, 2322-2329.
- Rothstein J. D., Dykes-hoberg M., Pardo C. A., Bristol L. A., Jin L., Kuncel R. W., Kanai Y., Hediger M. A., Wang Y., Schielke J. P. y Welty D. F. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675-686.
- Rowe W. B., Spreekmeester E., Meaney M. J., Quirion R. y Rochford J. (1998) Reactivity to novelty in cognitively-impaired and cognitively-unpaired aged rats and young rats. *Neuroscience* 83, 669-680.
- Rueter L. E. y Jacobs B. L. (1996) Changes in forebrain serotonin at the light-dark transition: correlation with behaviour. *NeuroReport* 7, 1107-1111.
- Rye D. B., Wainer B. H., Mesulam M. M., Mufson E. J. y Saper C. B. (1984) Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience* 13, 627-643.
- Saito S., Kobayashi S., Ohashi Y., Igarashi M., Komiya Y. y Ando S. (1994) Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *J. Neurosci. Res.* 39, 57-62.
- Salchner P., Lubec G. y Singewald N. (2004) Decreased social interaction in aged rats may not reflect changes in anxiety-related behaviour. *Behav. Brain Res.* 151, 1-8.
- Sale A., Maya-Vetancourt J. F., Medini P., Cenni M. C., Baroncelli L., De Pasquale R. y Maffei L. (2007) Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat. Neurosci.* 10, 679-681.
- Sale A., Berardi N. y Maffei L. (2009) Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci.* 32, 233-239.
- Sánchez-Prieto J., Budd D. C., Herrero I., Vázquez E. y Nicholls D. G. (1996) Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. *Trends Neurosci.* 19, 235-239.

- Sandi C., Loscertales M. y Guaza C. (1997) Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur. J. Neurosci.* 9, 637-642.
- Sandi C. y Pinelo-Nava T. (2007) Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plasticity* 1-20.
- Sandi C., Venero C. y Guaza C. (1996) Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur. J. Neurosci.* 8, 794-800.
- Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., Lee J., Duman R., Arancio O., Belzung C. y Hen R. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.
- Santiago M., Machado A. y Cano J. (1993) Regulation of prefrontal cortical dopamine release by dopamine receptor agonists and antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 239, 83-91.
- Sapolsky R. M., Krey L. C. y McEwen B. S. (1984) Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6174-6177.
- Sapolsky R. M., Krey L. C. y McEwen B. S. (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr. Rev.* 7, 284-301.
- Sapolsky R. M. (1999) Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp. Gerontol.* 721-732.
- Sapolsky R. M., Romero L. M. y Munck A. U. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55-89.
- Sapolsky R. (2005) The influence of social hierarchy on primate health. *Science* 308, 648-652.
- Sarre S. y Michotte Y. (2007) Liquid chromatographic methods used for microdialysis: an overview, en *Handbook of Microdialysis*, (Westerink B. H. C. y Cremers T. I. F. H., eds), pp. 233-250. Academic Press, London.
- Sarter M. y Bruno J. (1998) Age-related changes in rodent cortical acetylcholine and cognition: main effects of age versus age as an intervening variable. *Brain Res. Rev.* 27, 143-156.
- Sarter M. y Bruno J. P. (2000) Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience* 95, 933-952.
- Sarter M., Nelson C. L. y Bruno J. P. (2005) Cortical cholinergic transmission and cortical information processing in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 31, 117-138.
- Sarter M. y Parikh V. (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 48-56.

- Sarter M., Parikh V. y Howard H. R. (2009) Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 383-390.
- Sarter M. y Bruno J. P. (2004) Developmental origins of the age-related decline in cortical cholinergic function and associated cognitive abilities. *Neurobiol. Aging* 25, 1127-1139.
- Sawaguchi T. y Goldman-Rakic P. S. (1991) D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science* 251, 947-950.
- Schilwein S., Huston J. P. y Schwarting R. K. W. (2002) Open field habituation learning is improved by nicotine and attenuated by mecamylamine administered posttrial into the nucleus accumbens. *Neurobiol. Learn. Mem.* 77, 277-290.
- Schliebs R. y Arendt T. (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 113, 1625-1644.
- Schloesser R. J., Lehmann M., Martinowich K., Manji H. K. y Herkenham M. (2010) Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2010.34.
- Schoepp D. D. y Conn P. J. (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 13-20.
- Schrijver N. C. A., Bahr N. I., Weiss I. C. y Würbel H. (2002) Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 209-224.
- Seamans J. K., Floresco S. B. y Phillips A. G. (1998) D1 Receptor Modulation of Hippocampal-Prefrontal Cortical Circuits Integrating Spatial Memory with Executive Functions in the Rat. *J. Neurosci.* 18, 1613-1621.
- Seamans J. K. y Yang C. R. (2004) The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog. Neurobiol.* 74, 1-57.
- Seeman P. y Van Tol H. H. M. (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 264-270.
- Segar T. M., Kosckow J. V., Welge J. A. y Herman J. P. (2009) Heterogeneity of neuroendocrine stress responses in aging rat strains. *Physiol. Behav.* 96, 6-11.
- Segovia G., Del Arco A., De Blas M., Garrido P. y Mora F. (2008) Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behav. Brain Res.* 187, 304-311.
- Segovia G., Del Arco A. y Mora F. (1999a) Effects of aging on the interaction between glutamate, dopamine and GABA in striatum and nucleus accumbens of the awake rat. *J. Neurochem.* 73, 2063-2072.

- Segovia G., Del Arco A. y Mora F. (1999b) Role of glutamate receptors and glutamate transporters in the regulation of the glutamate-glutamine cycle in the awake rat. *Neurochem. Res.* 24, 779-783.
- Segovia G. y Mora F. (2001) Efectos del agonista glutamatérgico metabotrópico ACPD sobre la concentración de GABA, dopamina y acetilcolina en el núcleo accumbens de la rata despierta: estudio con microdiálisis. IX Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. Santiago de Compostela (2001). *Rev. Neurol.* 33, 775.
- Segovia G. y Mora F. (2005) Effects of the metabotropic glutamate receptor agonist, ACPD, on the extracellular concentrations of GABA and acetylcholine in the prefrontal cortex of the rat during the normal process of aging. *Brain Res. Bull.* 65, 11-16.
- Segovia G. y Mora F. (1998) Role of nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. *Brain Res. Bull.* 45, 275-279.
- Segovia G., Porras A., Del Arco A. y Mora F. (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1-29.
- Segovia G., Porras A. y Mora F. (1997) Effects of 4-aminopyridine on extracellular concentrations of glutamate in striatum of the freely moving rat. *Neurochem. Res.* 22, 1491-1497.
- Segovia G., Yagüe A. G., García-Verdugo J. M. y Mora F. (2006) Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res. Bull.* 70, 8-14.
- Seiden L. S., Sabol K. E. y Ricaurte G. A. (1993) Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32, 639-677.
- Selye H. (1976) Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can. Med. Assoc. J.* 115, 53-56.
- Sesack S. R. y Pickel V. M. (1992) Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* 320, 145-160.
- Sesack S. R., Hawrylak V. A., Matus C., Guido M. A. y Levey A. I. (1998) Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J. Neurosci.* 18, 2697-2708.
- Sharp T. y Zetterström T. (2007) What did we learn from microdialysis?, en *Handbook of Microdialysis*, (Westerink B. H. y Cremers T. I. F. H., eds), pp. 5-16. Academic Press, London.
- Shoji H. y Mizoguchi K. (2010), Acute and repeated stress differentially regulates behavioral, endocrine, neural parameters relevant to emotional and stress response in young and aged rats, *Behav. Brain Res.* doi: 10.1016/j.bbr.2010.03.025

- Shukitt-Hale B., McEwen J. J., Szprengiel A. y Joseph J. A. (2004) Effect of age on the radial arm water maze - a test of spatial learning and memory. *Neurobiol. Aging* 25, 223-229.
- Sibley D. R. y Monsma F. J. (1992) Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 61-69.
- Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Fisher S. K. y Uhler M. D. (1999) *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Oxford University Press, Oxford.
- Simonyi A., Ngomba R. T., Storto M., Catania M. V., Miller L. A., Youngs B., Giorgi-Gerevini V., Nicoletti F. y Sun G. Y. (2005) Expression of groups I and II metabotropic glutamate receptors in the rat brain during aging. *Brain Res.* 1043, 95-106.
- Smith A. L. y Corrow D. J. (2005) Modifications to husbandry and housing conditions of laboratory rodents for improved well-being. *ILAR Journal* 46, 140-147.
- Smith M. A. y Cizza G. (1996) Stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression are attenuated in aged Fischer 344/N rats. *Neurobiol. Aging* 17, 859-864.
- Soffié M., Hahn K., Terao E. y Eclancher F. (1999) Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. *Behav. Brain Res.* 101, 37-49.
- Solinas M., Chauvet C., Thiriet N., El Rawas R. y Jaber M. (2008) Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 17145-17150.
- Somogyi P., Tamás G., Lujan R. y Buhl E. H. (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* 26, 113-135.
- Sorg B. A., Li N., Wu W. R. y Bailie M. (2004) Activation of dopamine D1 receptors in the medial prefrontal cortex produces bidirectional effects on cocaine-induced locomotor activity in rats: effects of repeated stress. *Neuroscience* 127, 187-196.
- Sousa N., Almeida O. F., Holsboer F., Paula-Barbosa M. M. y Madeira M. D. (1998) Maintenance of hippocampal cell numbers in young and aged rats submitted to chronic unpredictable stress. Comparison with the effects of corticosterone treatment. *Stress* 2, 237-249.
- Spanagel R. y Weiss F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci.* 22, 521-527.
- Spencer S. J., Ebner K. y Day T. A. (2004) Differential involvement of rat medial prefrontal cortex dopamine receptors in modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to different stressors. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1008-1016.
- Sprengel R. y Seeburg P. H. (1993) The unique properties of glutamate receptor channels. *FEBS Lett.* 325, 90-94.
- Squire L. R. y Zola-Morgan S. (1988) Memory: brain systems and behavior. *Trends Neurosci.* 11, 170-175.

Stalnaker T. A., España R. A. y Berridge C. W. (2009) Copying behavior causes asymmetric changes in neuronal activation in the prefrontal cortex and amygdala. *Synapse* 63, 82-85.

Stanford J.A., Giardina K., Gerhardt G.A. (2000) In vivo microdialysis studies of age-related alterations in potassium-evoked overflow of dopamine in the dorsal striatum of Fischer 344 rats. *Int.J.Dev.Neurosci.* 18, 411-16.

Stanford J. A., Currier T. D., Purdom M. S. y Gerhardt G. A. (2001) Nomifensine reveals age-related changes in K⁺-evoked striatal dopamine overflow in F344 rats. *Neurobiol. Aging* 22, 495-502.

Steele T. D., Hodges D. B. Jr., Levesque T. R. y Locke K. W. (1997) D1 agonist dihydrexidine releases acetylcholine and improves cognitive performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58, 477-483.

Stemmelin J., Lazarius C., Cassel S., Kelche C. y Cassel J.C. (2000) Immunohistochemical and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats. *Neuroscience* 96, 275-289.

Stern Y. (2009) Cognitive reserve. *Neuropsychologia* 47, 2015-2028.

Strong R., Rehwaldt C. y Wood W. G. (1986) Intra-regional variations in the effect of aging on high affinity choline uptake, choline acetyltransferase and muscarinic cholinergic receptors in rat neostriatum. *Exp. Gerontol.* 21, 177-186.

Sullivan R. M. y Gratton A. (1998) Relationships between stress-induced increases in medial prefrontal cortical dopamine and plasma corticosterone levels in rats: role of cerebral laterality. *Neuroscience* 83, 81-91.

Sullivan R. M. y Gratton A. (2002) Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for the psychopathology: side matters. *Psychoneuroendocrinology* 27, 99-114.

Sullivan R. M. (2004) Hemispheric Asymmetry in Stress Processing in Rat Prefrontal Cortex and the Role of Mesocortical Dopamine. *Stress* 7, 131-143.

Szeligo F. y Leblond C. P. (1977) Response of the three main types of glial cells of cortex and corpus callosum in rats handled during suckling or exposed to enriched, control and impoverished environments following weaning. *J. Comp. Neurol.* 172, 247-263.

Sztainberg Y., Kuperman Y., Tsoory M., Lebow M. y Chen A. (2010) The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Molecular Psychiatry* doi:10.1038/mp.2009.151.

Szymánska M., Budziszewska B., Jaworka-Feil L., Basta-Kaim A., Kubera M., Leskiewicz M., Regulska M. y Lason W. (2009) The effect of antidepressant drugs on the HPA axis activity, glucocorticoid receptor level and FKBP51 concentration in prenatally stressed rats. *Psychoneuroendocrinology* 34, 822-832.

- Tang Y.P., Wang H., Feng R., Kyin M. y Tsien J. Z. (2001) Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41, 779-790.
- Tanila H., Taira T., Piepponen T. P. y Honkanen A. (1994) Effect of sex and age on brain monoamines and spatial learning in rats. *Neurobiol. Aging* 15, 733-741.
- Taylor P. y Brown J. H. (1999) Acetylcholine, en *Basic Neurochemistry*, (Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Fisher S. K. y Uhler M. D., eds), pp. 213-242. Lippincott-Raven, New York.
- Terry R. D. y Katzman R. (2001) Life span and synapses: will there be a primary senile dementia? *Neurobiol. Aging* 22, 347-348.
- Thiel C. M., Huston J. P. y Schwarting R. K. W. (1998) Cholinergic activation in frontal cortex and nucleus accumbens related to basic behavioral manipulations: handling, and the role of post-handling experience. *Brain Res.* 812, 121-132.
- Thiel C. M., Muller C. P., Huston J. P. y Schwarting R. K. W. (1999) High/versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* 93, 243-251.
- Thierry A. M., Godbout R., Mantz J. y Glowinski J. (1990) Influence of the ascending monoaminergic system on the activity of the rat prefrontal cortex, en *The prefrontal cortex: its structure, function and pathology*, (Uylings H. B. M., Van Eden C. G., De Bruin J. P. C., Corner M. A. y Feenstra M. G. P., eds), pp. 357-366. Elsevier, Amsterdam.
- Thierry A. M., Tassin J. P., Blanc G. y Glowinski J. (1976) Selective activation of mesocortical dopaminergic system by stress. *Nature* 263, 242-244.
- Timmerman W., Cisci G., Nap A., De Vries J. B. y Westerink B. H. C. (1999) Effects of handling on extracellular levels of glutamate and other amino acids in various areas of the brain measured by microdialysis. *Brain Res.* 833, 150-160.
- Timmerman W. y Westerink B. H. C. (1997) Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* 27, 242-261.
- Tomlinson J. W., Walker E. A., Bujalska I. J., Draper N., Lavery G. G., Cooper M. S., Hewison M. y Stewart P. M. (2004) 11 β -hydrosteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr. Rev.* 25, 831-866.
- Tsai T. R., Cham T. M., Chen K. C., Chen C. F. y Tsai T. H. (1996) Determination of acetylcholine by on-line microdialysis coupled with pre- and post-microbore column enzyme reactors with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 678, 151-155.
- Turner C. A. y King M. A. (2003) Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and dendritic morphology. *Dev. Psychobiol.* 43, 20-27.

- Tzschentke T. M. y Schmidt W. J. (2000) Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. *Crit. Rev. Neurobiol* 14, 131-142.
- Tzschentke T. M. (2001) Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog. Neurobiol.* 63, 241-320.
- Uhr M., Holsboer F. y Müller M. B. (2002) Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both *mdr1a* and *mdr1b* P-glycoproteins. *J. Neuroendocrinol.* 14, 753-759.
- Ulrich-Lai Y. M. y Herman J. P. (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 397-409.
- Ungerstedt U. (1991) Introduction to intracerebral microdialysis, en *Microdialysis in the Neurosciences*, (Robinson T. E. y Justice J. B., eds), pp. 3-18. Elsevier, Amsterdam.
- Uylings H. B. M., Groenewegen H. J. y Kolb B. (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.* 146, 3-17.
- Valenzuela M. J., Jones M., Wen W., Rae C., Graham S., Shnier R. y Sachdev P. (2003) Memory training alters hippocampal neurochemistry in healthy elderly. *NeuroReport* 14, 1333-1337.
- Valerio A., Belloni M., Gorno M. L., Tinti C., Memo M. y Spano P. (1994) Dopamine D2, D3 and D4 receptor mRNA levels in rat brain and pituitary during aging. *Neurobiol. Aging* 15, 713-719.
- van Eekelen J. A. M., Rots N. Y., Sutanto W. y de Kloet E. R. (1992) The effect of aging on stress responsiveness and central corticosteroid receptors in the Brown Norway rat. *Neurobiol. Aging* 13, 159-170.
- van Praag H., Christie B. R., Sejnowski T. J. y Gage F. H. (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13427-13431.
- van Praag H., Kempermann G. y Gage F. H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191-198.
- Varty G. B., Paulus M. P., Braff D. L. y Geyer M. A. (2000) Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol. Psychiatry* 47, 864-873.
- Venema K., Leever W., Bakker J. O., Haayer G. y Korf J. (1983) Automated precolumn derivatization device to determine neurotransmitter and other amino acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 260, 371-376.
- Venero C. y Borrell J. (1999) Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2465-2473.

Venero J. L., Machado A. y Cano J. (1993) Effect of ageing on monoamine turnover in the prefrontal cortex of rats. *Mech. Ageing Dev.* 72, 105-118.

Verma A. y Moghaddam B. (1996) NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed performance in rats: modulation by dopamine. *J. Neurosci.* 16, 373-379.

Vertes R.P. (2004), Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat, *Synapse* 51, 32-58.

Vinson P. N. y Justice J. B., Jr. (1997) Effect of neostigmine on concentration and extraction fraction of acetylcholine using quantitative microdialysis. *J. Neurosci. Methods* 73, 61-67.

Watanabe M., Kodama T. y Hikosaka K. (1997) Increase of extracellular dopamine in primate prefrontal cortex during a working memory task. *J. Neurophysiol.* 78, 2795-2798.

Wei J., Walton E. A., Milici A. y Buccafuso J. J. (1994) m1- m5 muscarinic receptor distribution in rat CNS by RT-PCR and HPLC. *J. Neurochem.* 63, 815-821.

Weinberg, M.S., Johnson, D.C., Bhatt, A.P., Spencer, R.L. (2010), Medial prefrontal cortex activity can disrupt the expression of stress response habituation, *Neuroscience* doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.04.006

Wenk G. L. (1997) The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiol. Learn. Mem.* 67, 85-95.

West M. J. (1993) New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol. Aging* 14, 275-285.

Westerink B. H. C., Damsma G., Rollema H., De Vries J. B. y Horn A. S. (1987) Scope and limitations of in vivo brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. *Life Sci.* 41, 1763-1776.

Westerink B. H. C., Hofsteede H. M., Damsma G. y De Vries J. B. (1988) The significance of extracellular calcium for the release of dopamine, acetylcholine and amino acids in conscious rats, evaluated by brain microdialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 337, 373-378.

Westerink B. H. C. y Justice J. B. (1991) Microdialysis compared with other *in vivo* release models, en *Microdialysis in the Neurosciences*, (Robinson T. E. y Justice J. B., eds), pp. 23-46. Elsevier, Amsterdam.

Westerink B. H. C. (1995) Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav. Brain Res.* 70, 103-124.

Westerink B. H. C. (2000) Analysis of biogenic amines in microdialysates of the brain. *J. Chromatogr.* 747, 21-32.

- Westerink B. H., Rea K., Oldenziel W. H. y Cremers T. I. F. H. (2007) Microdialysis of glutamate and GABA in the brain: analysis and interpretation, en *Handbook of Microdialysis*, (Westerink B. H. C. y Cremers T. I. F. H., eds), pp. 17-32. Academic Press, London.
- Whalley L. J., Starr J. M., Athawes R., Hunter D., Pattie A. y Dearey I. J. (2000) Childhood mental ability and dementia. *Neurology* 55, 1455-1459.
- Williams G. V. y Goldman-Rakic P. S. (1995) Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376, 572-575.
- Williams G. V. y Castner S. A. (2006) Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience* 139, 263-276.
- Wilson R. S., Mendes de Leon C. F., Barnes L. L., Schneider J. A., Bienias J. L., Evans D. A. y Bennett D. A. (2002) Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. *JAMA* 287, 742-748.
- Winterfeld K. T., Teuchert-Noodt G. y Dawirs R. R. (1998) Social environment alters both ontogeny of dopamine innervation of the medial prefrontal cortex and maturation of working memory in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Neurosci. Res.* 52, 201-209.
- Wolf D. C. y Horwitz S. B. (1992) P-glycoprotein transports corticosterone and is photoaffinity-labeled by the steroid. *International Journal of Cancer* 52, 141-146.
- Wolf O. T., Convit A., de Leon M. J., Caraos C. y Qadri S. F. (2002) Basal hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and corticotropin feedback in young and older men: relationships to magnetic resonance imaging-derived hippocampus and cingulate gyrus volumes. *Neuroendocrinology* 75, 241-249.
- Wolf O. T. (2003) HPA axis and memory. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17, 287-299.
- Wolfer D. P., Litvin O., Morf S., Nitsch R. M., Lipp H. y Würbel H. (2004) Cage enrichment and mouse behavior. *Nature* 432, 821-822.
- Wood D. A., Siegel A. K. y Rebec G. V. (2006) Environmental enrichment reduces impulsivity during appetitive conditioning. *Physiol. Behav.* 88, 132-137.
- Woodson J. C., Macintosh D., Fleshner M. y Diamond D. M. (2003) Emotion-induced amnesia in rats: Working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learn. Mem.* 10, 326-336.
- Würbel H. (2002) Behavioral phenotyping enhanced - beyond (environmental) standardization. *Genes, Brain Behav.* 1, 3-8.
- Würbel H. (2001) Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci.* 24, 207-211.
- Yaffe K., Fiocco A., Lindqvist K., Vittinghoff E., Simonsick E. M., Newman A. B., Satterfield S., Rosano C., Rubin S. M., Ayonayon H. N. y Harris T. B. (2009) Predictors of maintaining cognitive function in older adults. *Neurology* 72, 2029-2035.

- Yau J. L. W., Morris R. G. M. y Seckl J. R. (1994) Hippocampal corticosteroid receptor mRNA expression and spatial learning in the aged Wistar rat. *Brain Res.* 657, 59-64.
- Yau J. L. W. y Seckl J. R. (2001) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I in the brain; thickening the glucocorticoid soup. *Molecular Psychiatry* 6, 611-614.
- You Z.B., Tzschentke T. M., Brodin E. y Wise R. A. (1998) Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases cholecystokinin, glutamate, and dopamine release in the nucleus accumbens: an *in vivo* microdialysis study in freely moving rats. *J. Neurosci.* 18, 6492-6500.
- Yuen E. Y., Liu W., Karatsoreos I. N., Feng J., McEwen B. S. y Yan Z. (2009) Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 14075-14079.
- Yurek D. M., Hipkens S. B., Hebert M. A., Gash D. M. y Gerhardt G. A. (1998) Aged related decline in striatal dopamine release and motoric function in Brown Norway/Fisher 344 hybrid rats. *Brain Res.* 791, 246-256.
- Zahrt J., Taylor J. R., Mathew R. G. y Arnsten A. F. (1997) Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *J. Neurosci.* 17, 8528-8535.
- Zanassi P., Paolillo M., Montecucco A., Avvedimento E. V. y Schinelli S. (1999) Pharmacological and molecular evidence for dopamine D1 receptor expression by striatal astrocytes in culture. *J. Neurosci. Res.* 58, 544-552.
- Zatorre R. J., Chen J. L. y Penhune V. B. (2007) When the brain plays music: auditory-motor interactions in music perception and production. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 547-558.
- Zhao M.G., Toyoda H., Wang Y.K. y Zhuo M. (2009) Enhanced synaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of adult wild mice as compared with that in laboratory mice. *Mol. Brain* 2, 11-17.
- Zhu J., Green T., Bardo M. T. y Dwoskin L. P. (2004) Environmental enrichment enhances sensitization to GBR 12935-induced activity and decreases dopamine transporter function in the medial prefrontal cortex. *Behav. Brain Res.* 148, 107-117.
- Zhu J., Apparsundaram S., Bardo M. T. y Dwoskin L. P. (2005) Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 93, 1434-1443.
- Zhu J., Bardo M. T., Green T. A., Wedlund P. J. y Dwoskin L. P. (2007) Nicotine increases dopamine clearance in medial prefrontal cortex in rats raised in an enriched environment. *J. Neurochem.* 103, 2575-2588.
- Zimmermann A., Stauffacher M., Langhans W. y Wurbel H. (2001) Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav. Brain Res.* 121, 11-20.
- Zoli M. y Agnati L. F. (1996) Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses. *Prog. Neurobiol.* 49, 363-380.

Zoli M., Jansson A., Syková E., Agnati L. F. y Fuxe K. (1999) Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 142-150.

Zoli M., Torri C., Ferrari R., Jansson A., Zini I., Fuxe K. y Agnati L. F. (1998) The emergence of the volume transmission concept. *Brain Res. Rev.* 26, 136-147.